

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTUDIO SOBRE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN  
EL DAÑO NEURONAL INDUCIDO POR INHIBICION  
GLICOLITICA: PAPEL DEL GLUTAMATO Y DE LAS  
POZAS INTRACELULARES DE CALCIO DEL  
RETICULO ENDOPLASMICO”

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. KARLA HERNÁNDEZ FONSECA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. DE LOURDES MASSIEU TRIGO

MÉXICO, D.F.



COORDINACIÓN

MARZO, 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

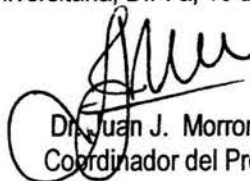
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 01 de diciembre de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Hernández Fonseca Karla**, con número de cuenta 93382874, con la tesis titulada: **"Estudio sobre los mecanismos involucrados en el daño neuronal inducido por inhibición glicolítica: papel del glutamato y de las pozas intracelulares de calcio del retículo endoplásmico"**, bajo la dirección del(a) **Dra. Lourdes Massieu Trigo**.

Presidente:	Dr. Arturo Hernández Cruz
Vocal:	Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez
Secretario:	Dra. Lourdes Massieu Trigo
Suplente:	Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
Suplente:	Dra. Ana Brigida Clorinda Alvarez Díaz

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 16 de febrero de 2004

  
Dr. Juan J. Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Biol. Karla Hernández Fonseca  
FECHA: 26. Febrero. 04  
FIRMA: J. HERNÁNDEZ FONSECA K.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. LOURDES MASSIEU EN EL DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ CON EL APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT, PROYECTO 40306-M) Y DE PAPIIT-UNAM (PROYECTO IN222503), ASI COMO POR LA BECA DE MAESTRIA OTORGADA POR EL CONACyT Y LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO (DGEP).

A MIS PADRES

A MI PAPA, POR TODO TU AMOR,  
APOYO Y ESPECIALMENTE POR  
ENSEÑARME A SER QUIEN SOY.

A MI MAMITA, POR TODO EL CARIÑO  
Y AMOR QUE ME HAS DADO.  
Y PRINCIPALMENTE POR EL  
APOYO Y COMPRESION  
QUE ME HAS BRINDADO.

A MIS HERMANOS,  
JIBARO, CHENTE, ENANO Y LESLY

A JORGE,  
POR QUE SIEMPRE VAS A  
ESTAR EN MI CORAZÓN.  
BEEEEEEEEEEEE!!!!!!!!!!!!

## AGRADECIMIENTOS

---

Agradezco a la Dra. Lourdes Massieu por haberme recibido en su laboratorio y enseñarme que la investigación es sorprendente. Además de ser una tutora excelente, sabe ser también una amiga en el momento preciso.

A mis sinodales, Dra. Clorinda Arias, Dra. Lourdes Massieu, Dr. Gabriel Gutiérrez, Dr. Luis Vaca y al Dr. Arturo Hernández por sus sugerencias y comentarios.

A mi Comité Tutorial: Dra. Clorinda Arias, Dra. Lourdes Massieu y al Dr. Arturo Hernández por llevar paso a paso este trabajo y además por sus comentarios para mi formación profesional.

A Tere Montiel, gracias por enseñarnos todo lo que tú sabes. Además de ser nuestra amiga y mamá en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio: Perla, Mari, Jana, Alberto, Octavio, Ana y Miguel (adoptivo) por compartir mi amor por la investigación y por todos los momentos de risas, que nos hacen más ameno el día. Y a Ceci, por ayudarnos en todo lo que necesitamos.

A Perla, gracias amiga por compartir conmigo todos los sucesos de mi vida y por ser una apoyo incondicional.

A Mónica, por que hemos pasado momentos maravillosos y divertidos. Además se ser mi conciencia en algunas ocasiones y mi diablito en otras. PUMAS!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

A Jorge, Héctor (Iudovic) y Francisco (mandi) por ser mis amigos incondicionales. Y por que se, que aún y cuando nuestras vidas se separen, nuestras almas van a estar siempre juntas.

A Rodrigo (cañas), Lenin, Benito y Claudia por ser quienes son y estar presentes en el momento indicado.

# INDICE

---

Índice .....	1
Resumen .....	3
Introducción .....	5
Receptores a glutamato .....	6
Receptores no-NMDA .....	7
Receptor NMDA .....	8
Receptor metabotrópico .....	11
Transportadores de glutamato .....	13
Excitotoxicidad .....	15
Isquemia y muerte excitotóxica .....	17
Excitotoxicidad y el estado energético celular .....	18
La enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa .....	21
Calcio intracelular y la muerte excitotóxica .....	23
Retículo endoplásmico .....	25
La SERCA .....	26
El receptor a IP <sub>3</sub> .....	27
El receptor a rianodina .....	29
Participación del RE en la muerte excitotóxica .....	31
Hipótesis .....	34
Objetivo general .....	35
Objetivos específicos .....	36
Metodología .....	37



Cultivos de hipocampo .....	37
Tratamientos farmacológicos .....	38
Evaluación de la muerte neuronal en los cultivos .....	40
Determinación de los niveles de ATP .....	41
Determinación de aminoácidos excitadores en el medio extracelular .....	42
Materiales .....	42
Estadística .....	43
Resultados .....	44
Discusión .....	62
Conclusiones .....	77
Referencias .....	78

## RESUMEN

---

Después de un episodio isquémico ó hipoglicémico ocurre muerte neuronal desencadenada por la disminución de los niveles de ATP, el aumento en los niveles de glutamato extracelular y el incremento en la concentración de calcio intracelular. La muerte que se presenta en estas condiciones es de tipo excitotóxico. Recientemente se ha establecido una estrecha relación entre las propiedades tóxicas del glutamato y el estado energético celular. Una de las regiones más vulnerables al daño isquémico/hipoglicémico es el hipocampo. En el presente trabajo se estudio el efecto del yodoacetato, un inhibidor de la enzima glicolítica gliceraldehido-3-fosfato, sobre la muerte neuronal y los niveles extracelulares de aminoácidos. Además se estudio el efecto de compuestos capaces de modificar el almacenamiento de calcio del retículo endoplásmico sobre la muerte neuronal inducida por el yodoacetato. Se observó que la muerte neuronal es dependiente de la concentración de yodoacetato y de su tiempo de exposición. El tratamiento con 50 $\mu$ M de yodoacetato indujo un 50 % de muerte, así como una reducción de los niveles de ATP (~ 50 %) a las 24 h. La muerte inducida por yodoacetato (50  $\mu$ M) es contrarrestada por antagonistas de receptores a glutamato (MK-801 y NBQX), y por sustratos energéticos (acetoacetato y piruvato). De igual forma, se observó que los niveles de ATP fueron restablecidos significativamente con la administración de acetoacetato y piruvato. El tratamiento con agonistas del receptor a reanodina (cafeína y reanodina) exacerbó la muerte, y la administración de antagonistas del receptor a reanodina e IP<sub>3</sub> (dantroleno, reanodina, y xestospongina C, respectivamente) previene el daño inducido por yodoacetato. Se administraron inhibidores de la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico (SERCA) (tapsigargina, ácido ciclopiazónico y TMB-8), los cuales no modificaron el efecto del yodoacetato sobre la muerte neuronal. No se observó cambio alguno en los niveles extracelulares de aminoácidos excitadores a los 30 min y 3.5 h después del tratamiento con el inhibidor

glicolítico. Estos resultados indican que la muerte inducida por la inhibición glicolítica es de tipo excitotóxica, debido a que los antagonistas de los receptores a glutamato previenen la muerte. La protección obtenida con los antagonistas de los receptores a reanodina e  $IP_3$  indica una contribución de las pozas intracelulares de calcio del retículo endoplásmico al proceso de muerte. De la misma manera el proceso de muerte está relacionado con los niveles energéticos celulares, ya que la presencia de sustratos energéticos la previenen.

## INTRODUCCIÓN

---

El glutamato es el aminoácido libre más abundante en el cerebro y es el neurotransmisor excitador predominante del sistema nervioso central de los vertebrados. Además de participar en el metabolismo celular, el glutamato posee un papel crítico en la fisiología sináptica y en la plasticidad neuronal (McDonald y Johnston, 1990). También se encuentra involucrado en los procesos de aprendizaje y de memoria, a través de los cambios en la eficiencia sináptica dependientes del uso, como la potenciación y la depresión a largo plazo. En ciertas condiciones patológicas, se presenta un aumento en la concentración extracelular de glutamato y otros aminoácidos excitadores, lo que puede provocar la sobreactivación de las células nerviosas y desencadenar un mecanismo excitotóxico que culmina en la muerte neuronal (ver más adelante; Smith, 2000). El ácido glutámico contribuye de manera importante al daño neuronal que se presenta en los procesos de neurodegeneración asociados a padecimientos neurológicos agudos como el trauma cerebral, la hipoglucemia y la isquemia cerebral y se ha sugerido su participación en padecimientos progresivos como la Corea de Huntington, la Enfermedad de Alzheimer, la Esclerosis amiotrófica Lateral, la Enfermedad de Parkinson y la Demencia Asociada al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

Bajo condiciones normales, la mayor parte del glutamato libre en el cerebro proviene de la síntesis local a partir de la glutamina y de intermediarios del ciclo de

Krebs. Una fracción considerable proviene del reciclamiento de proteínas del cerebro. En las terminales sinápticas, el glutamato es almacenado en vesículas y liberado por un mecanismo dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Una vez en el espacio sináptico, éste se une y activa receptores post-sinápticos específicos a glutamato. Varios tipos de receptores a glutamato han sido identificados (Nakanishi, 1992).

## **Receptores a glutamato**

El glutamato interactúa con dos tipos generales de receptores, los ionotrópicos y los metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos se denominan de acuerdo a su agonista farmacológico, y pueden ser diferenciados gracias a sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas en tres grupos: N-metil-D-aspartato (NMDA), kainato (KA) y  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxasolpropionato (AMPA) (Watkins y Olverman, 1987). Los receptores a AMPA y kainato comparten algunas características, por lo cual son llamados receptores no-NMDA. Los tres receptores ionotrópicos son permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , mientras que el receptor NMDA y sólo algunos receptores AMPA y kainato son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  (Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993). Esta permeabilidad diferencial esta dada por la combinación de subunidades que conforman el receptor. Los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas que unen GTP (proteínas G) y modulan de producción de mensajeros intracelulares (Ozawa et al., 1998).

## *Receptores no-NMDA*

Dentro de los receptores no-NMDA se encuentran los receptores AMPA y los receptores Kainato. Estos son complejos formados por cinco subunidades hetero-oligoméricas. Ambos receptores están acoplados a canales iónicos permeables tanto a  $\text{Na}^+$  como a  $\text{K}^+$  (Fig. 1). La mayoría de canales asociados a receptores AMPA no son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , pero algunos de estos receptores forman canales iónicos permeables a este catión (Michaelis, 1997).

El receptor AMPA media la fase rápida inicial de la neurotransmisión en el sistema nervioso central (SNC). Usando técnicas de clonación se han identificado cuatro subunidades para este receptor (GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4). Las cuatro subunidades, GluR1-GluR4, tienen un tamaño similar (~900 aminoácidos), presentan un 68-73% de semejanza en la secuencia de aminoácidos (Ozawa et al, 1998), y están conformadas por cuatro dominios transmembranales (TM1, TM2, TM3 y TM4).

En el sistema nervioso central, las propiedades funcionales del receptor AMPA están influenciadas, en gran medida, por la subunidad GluR2, ya que la presencia de esta subunidad le confiere al canal una baja permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto se debe a que la subunidad GluR2 presenta en el segundo segmento transmembranal una arginina en vez de una glutamina, como es el caso del receptor a NMDA que es muy permeable a  $\text{Ca}^{2+}$  (Stone y Addae, 2002). El receptor a AMPA presenta al menos tres sitios de unión independientes en los cuales pueden

actuar tanto agonistas como antagonistas (Fig. 1). El sitio de unión a glutamato es el mismo para antagonistas competitivos, como: 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxalina (NBQX) y 6-(1H-imidazol-1-yl)-7-nitro-2,3(1H,4H-quinoxalinediona (YM90K).

El receptor Kainato esta conformado por 5 subunidades: GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2, esta poco estudiado debido a que este agonista también estimula los receptores AMPA. Todas las subunidades presentes en la estructura básica de los receptores AMPA/Kainato, incluyen los cuatro segmentos transmembrales. Las subunidades GluR5-GluR7 tienen un tamaño similar (~900 aminoácidos) y una similitud del 75-80% en la secuencia de aminoácidos y 40% con las subunidades del receptor AMPA. Las subunidades KA1 –KA2 son un poco más grandes que GluR5-GluR7 (~970 aminoácidos) y tienen un 70 % de identidad en la secuencia de aminoácidos (Ozawa et al, 1998).

### *Receptor NMDA*

El receptor a NMDA responde a glutamato más tardíamente que los receptores no-NMDA y su contribución a la corriente depende de un componente lento de la corriente excitadora postsináptica. El receptor NMDA es altamente permeable a  $Ca^{2+}$  y su apertura depende del voltaje, debido a que se encuentra normalmente bloqueado por un ión  $Mg^{2+}$  que es liberado al despolarizarse la membrana, abriendo el canal. Este receptor presenta por lo menos seis sitios diferentes de unión a ligandos (Fig. 1). Estos sitios son: 1) sitio de unión al ligando

endógeno (glutamato y D-aspartato); 2) sitio de unión a glicina (también es un ligando endógeno) cuya ocupación facilita la unión del glutamato con el receptor; 3) sitio de unión a poliaminas, como son la espermina y la espermidina. Estos compuestos a bajas concentraciones, micromolares promueven la apertura del canal y a altas concentraciones bloquean el canal de manera dependiente de voltaje (Lynch y Guttman, 2002); 4) sitio de unión del  $Mg^{2+}$ , que se encuentra en el poro del canal, aquí también se une el (+)-5-metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo(a,d)cicloheptano-5,10-imina maleato (MK-801), un potente antagonista farmacológico no competitivo del receptor); 5) sitio de unión a  $Zn^{2+}$  y 6) sitio modulador de unión a glutatión.

En la última década se ha determinado la composición de las subunidades del receptor NMDA. Este receptor es un tetrámero conformado por una subunidad NMDAR1 (NR1) en combinación con una o más subunidades NMDAR2 (NR2), y menos comúnmente una subunidad NMDAR3 (NR3) (Kemp y McKernan, 2002). Existen seis isoformas de la subunidad NR1 generadas por cortes alternativos en el mismo gen, denominadas (NR1A-NR1G). La subunidad NR2, se presenta en cuatro isoformas (NR2A-NR2D), provenientes de distintos genes. En contraste con la subunidad NR1, la combinación de cualquiera de las isoformas de NR2 no produce receptores funcionales. Sin embargo, la combinación de la subunidad NR1 con cualquiera de las subunidades NR2 sí produce receptores funcionales. Las características farmacológicas y electrofisiológicas del receptor varían de acuerdo a la combinación de las subunidades. Las subunidades NR1 y NR2A-NR2D están compuestas de 938, 1464, 1482, 1250 y 1323 aminoácidos,



respectivamente. La subunidad NR1 muestra baja homología (25-28% de identidad en la secuencia de aminoácidos) con otras subunidades GluR. La similitud entre las secuencias de aminoácidos entre las subfamilias NR1 y NR2 es baja ~18 % y entre la familia NR2 es del 40 - 50 % (Nakanishi, 1992; Hollmann y Heinemann, 1994).

Las subunidades NR1 y NR2A-NR2D presentan una asparagina en el sitio correspondiente a la glutamina/arginina en los receptores AMPA. Esta asparagina determina la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y el bloqueo del  $\text{Mg}^{2+}$  en el canal del receptor NMDA (Ozawa et al, 1998).

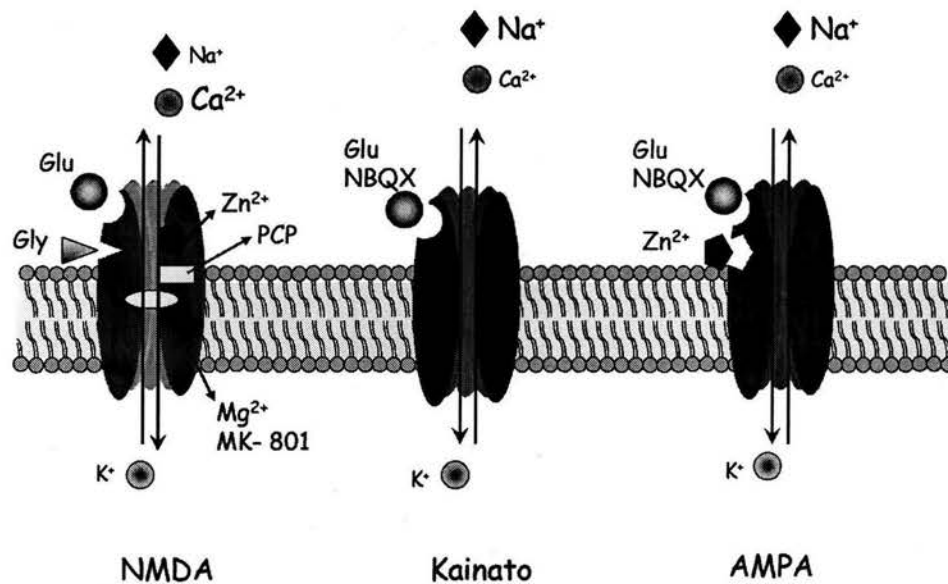


Figura 1. Representación esquemática de los diferentes tipos de receptores ionotrópicos a glutamato, y sus principales moduladores.

## *Receptor metabotrópico*

Los receptores metabotrópicos se encuentran acoplados a una proteína G y además a fosfolipasa C (PLC) ó a la adenilato ciclasa y en general producen cambios en la función celular y en la conductancia membranal en una escala temporal más lenta que los receptores ionotrópicos (Stone y Addae, 2002). Los que están acoplados a PLC provocan la hidrólisis de fosfolípidos de inositol, produciendo segundos mensajeros como el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1-4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). El DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) que promueve la fosforilación de proteínas y el IP<sub>3</sub> moviliza Ca<sup>2+</sup> de pozas intracelulares, al activar a sus receptores en el retículo endoplásmico. Algunos receptores metabotrópicos inhiben a la adenilato ciclasa (AC) y por lo tanto la formación de AMPc.

Se han clonado 8 diferentes subtipos, clasificados en 3 grupos de acuerdo con la homología de su secuencia, su farmacología y su mecanismo de transducción: mGluR1 y mGluR5 (grupo I), que activan a la PLC; mGluR2 y mGluR3 (grupo II) y mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8 (grupo III) acoplados negativamente a la AC. Los mGluRs se encuentran en la presinápsis y en la postsinápsis. Los grupos II y III se encuentran primordialmente en terminales presinápticas y el grupo I en terminales postsinápticas.

Los ocho subtipos mGluR1-mGluR8 están muy relacionados en su estructura primaria. La secuencia de aminoácidos de los mGluRs muestran más del 40 % de identidad y todos tienen siete regiones transmembranales. Todos los receptores mGluRs son proteínas considerablemente grandes (854- 1179

aminoácidos) con una región hidrofóbica N-terminal grande de ~550 aminoácidos, una región central de ~250 aminoácidos que incluye los siete dominios transmembranales y una región C-terminal (Nakanishi, 1992; Hollmann y Heinemann, 1994).

Este receptor tiene como ligando endógeno el glutamato, y como agonistas farmacológicos al quisqualato, al ibotenate y al 1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato (ACPD).

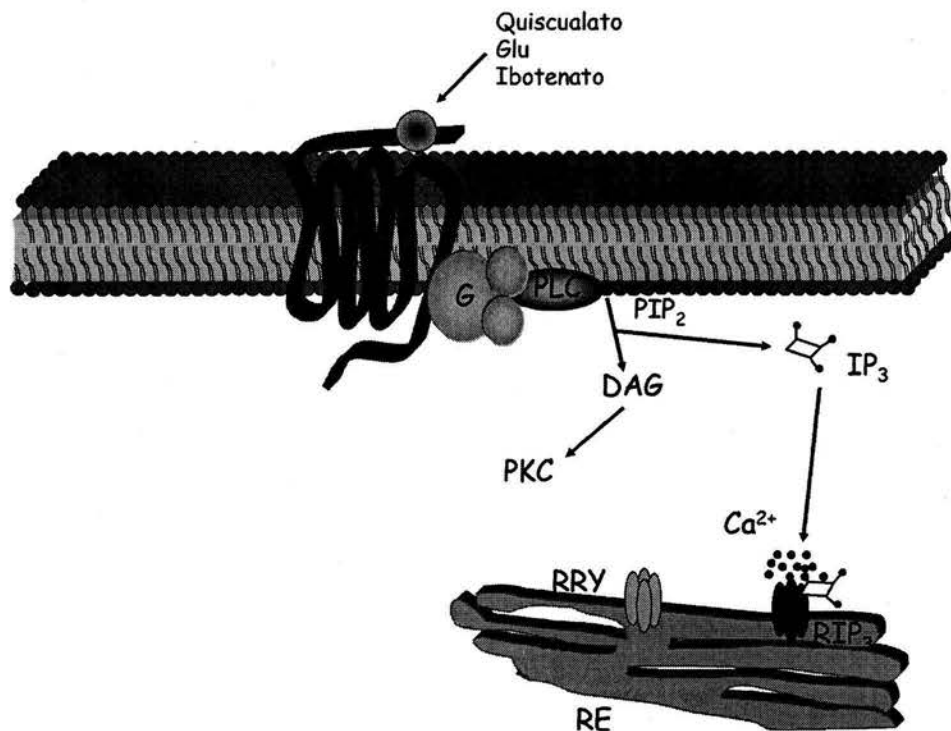


Figura 2. Representación esquemática de un subtipo de receptor metabotrópico (grupo I), el cual se encuentra acoplado vía proteína G (G) a fosfolipasa C (PLC). La PLC cataliza la producción de diacilglicerol (DAG) que activa a una proteína cinasa C (PKC) que activa una serie de enzimas intracelulares, e inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) el cual promueve la liberación de calcio de retículo endoplásmico.

## Transportadores de glutamato

La eliminación de los aminoácidos excitadores (glutamato y aspartato) de la hendidura sináptica y el mantenimiento de la concentración extracelular de glutamato en un rango micromolar, son procesos realizados por los transportadores de alta afinidad dependientes de sodio ( $\text{Na}^+$ ) (Nicholls y Attwell, 1990; Fontana et al., 2002).

El funcionamiento de los transportadores de glutamato depende de la existencia de un gradiente de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana plasmática, el cual es mantenido por la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . En la actualidad han sido clonados cinco transportadores de glutamato de alta afinidad dependientes de  $\text{Na}^+$  (Danbolt, 2001): transportador de glutamato/aspartato (GLAST) (Storck et al., 1992), transportador de glutamato tipo 1 (GLT-1) (Pines et al., 1992), acarreador de aminoácidos excitadores tipo 1 (EAAC1) (Kanai and Heideger, 1992), transportador de aminoácidos excitadores tipo 4 (EAAT4) (Fairman et al., 1995) y 5 (EAAT5) (Arriza et al., 1997). La captura de glutamato esta acoplada a la translocación de 2 o 3 iones  $\text{Na}^+$  más un ión hidrógeno ( $\text{H}^+$ ), seguido del contra transporte de un ión potasio ( $\text{K}^+$ ) y un anión hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) (Zerangue y Kavanaugh, 1996).

GLAST y GLT-1 se encuentran localizados principalmente en las células gliales (Schmitt et al., 1997; Rosthein et al., 1994) y al parecer son los transportadores predominantes en el cerebro. EAAC1 ha sido localizado

exclusivamente en neuronas, tanto glutamatérgicas como no-glutamatérgicas (Rothstein et al., 1994). Estudios de microscopia electrónica han revelado que este transportador solo se encuentra localizado en los somas de las neuronas y no en las terminales presinápticas (Rothstein et al., 1994). EAAT4 se encuentra exclusivamente en las dendritas de las células de Purkinje del cerebelo (Fairman et al., 1995) y EAAT5 se expresa selectivamente en las células de Müller de la retina (Arriza et al., 1997).

Además de los cinco transportadores de glutamato dependientes de  $\text{Na}^+$ , hay evidencia de la existencia de dos transportadores de glutamato dependientes de cloro ( $\text{Cl}^-$ ) en células de glioma y en cultivos primarios de astrocitos (Kimelberg et al., 1979).

El glutamato capturado por las células gliales es convertido, por la glutamina sintetasa (una enzima exclusiva de las células gliales), a glutamina, la cual es liberada al medio extracelular y capturada por las neuronas para convertirla a glutamato por una glutaminasa, permitiendo el reciclamiento del neurotransmisor.

Dada la función de los transportadores de glutamato de alta afinidad de mantener la concentración de glutamato extracelular a niveles fisiológicos, la alteración en su actividad o en su contenido puede contribuir a aumentar la vulnerabilidad a la toxicidad de este neurotransmisor.

## **Excitotoxicidad**

Los primeros estudios que sugirieron el papel del glutamato como neurotransmisor excitador fueron realizados por Curtis y colaboradores en 1954, en donde se observó que el glutamato y sus análogos superfundidos en células de médula espinal de gato, provocaba un aumento en la tasa de disparo de éstas. Por otra parte en 1957, Lucas y Newhouse observaron por primera vez que la inyección intraperitoneal de glutamato en ratas producía degeneración de la capa interna en la retina. Posteriormente, Olney y colaboradores (1969) observaron que la administración de glutamato a ratones inmaduros producía neurodegeneración en algunas regiones del sistema nervioso central, como el hipotálamo y otras zonas cuya barrera hematoencefálica no estaba totalmente desarrollada. Dada la correlación entre la capacidad del glutamato para despolarizar, y su potencialidad neurotóxica, Olney en 1978 acuñó el término excitotoxicidad para referirse a la capacidad de los aminoácidos excitadores bajo ciertas condiciones, de destruir a las células nerviosas. Se sugirió que la muerte neuronal excitotóxica se debe al agotamiento de las pozas energéticas debido a su excitación prolongada.

En 1987, Choi demuestra que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula es un factor preponderante para la muerte excitotóxica, ya que el catión activa una serie de enzimas (proteasas, endonucleasas, fosfolipasas y xantina oxidasa), y vías metabólicas que dan lugar a la desintegración de proteínas y fosfolípidos de la membrana. Lo anterior puede traer como consecuencia la generación de radicales

libres, y consecuentemente daño del DNA, proteínas y lípidos membranales contribuyendo al deterioro y la muerte neuronal (Fig. 3)

En los 90's, se retomó la hipótesis excitotóxica inicialmente propuesta por Olney, sin descartar la participación del calcio como una señal de inicio del proceso de muerte excitotóxica. Sin embargo, se ha dado más énfasis al estado energético de la célula, centrándose en la participación de la mitocondria en la muerte excitotóxica.

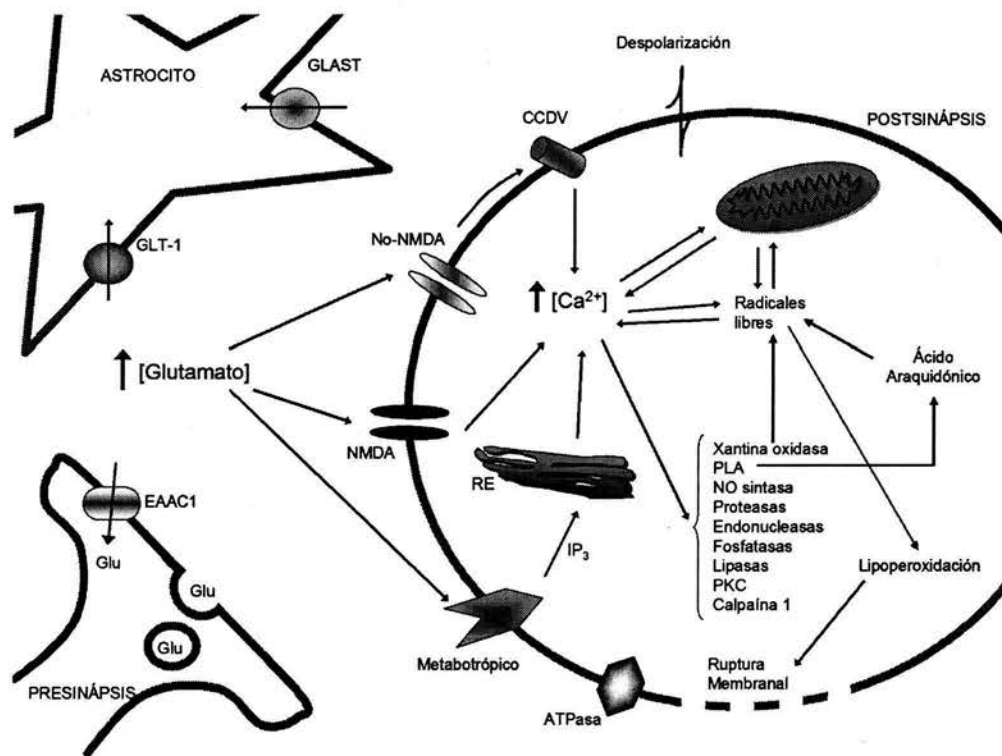


Figura 3. Posibles vías metabólicas involucradas en la muerte neuronal producida por excitotoxicidad. La activación de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos permite una entrada masiva de calcio. El aumento en la concentración de calcio intracelular activa una serie de enzimas que contribuyen al daño neuronal. La pérdida de la integridad de la membrana plasmática da lugar a la fuga de glutamato al medio extracelular, lo que contribuye a la activación prolongada de los receptores glutamatérgicos de neuronas vecinas. A su vez, la entrada de calcio promueve la liberación de glutamato por exocitosis, creándose un sistema de retroalimentación que redunde en la sobreexcitación neuronal prolongada.

## **Isquemia y muerte excitotóxica**

La isquemia cerebral asociada con los accidentes cerebrovasculares tiene un gran impacto debido a la severidad de sus secuelas. Los trastornos vasculares cerebrales se ubican entre las tres primeras causas de muerte en Norteamérica y en Europa Occidental, y son la causa principal de incapacidad permanente en los adultos, principalmente por el traumatismo cerebral y la hipoxia perinatal. En México los accidentes cerebrovasculares representan la 6ª causa de muerte (INEGI, 20001). Independientemente de la causa, la isquemia cerebral se presenta cuando existe una reducción del flujo sanguíneo cerebral, provocando daño neuronal irreversible en la zona en donde se interrumpe por completo el flujo sanguíneo (foco isquémico). Sin embargo, en la zona circundante al foco isquémico, el daño neuronal se desarrolla lentamente. Esta región es denominada como zona de penumbra o zona perifocal (Massieu, 1998).

Un gran número de estudios apoyan la hipótesis de que la muerte neuronal asociada con la isquemia cerebral se debe a un proceso excitotóxico mediado por la sobreactivación de los receptores a glutamato. En experimentos de microdiálisis en diversos modelos de isquemia cerebral se ha demostrado que inmediatamente después del inicio del episodio isquémico se presenta un incremento en la concentración extracelular de glutamato y aspartato (Benveniste et al. 1984). En las regiones donde ocurre este incremento se presenta muerte neuronal días después del evento isquémico, la cual se ha denominado muerte neuronal retardada.



Estudios un vitro, han demostrado que se presenta muerte excitotóxica cuando las células son expuestas a glutamato como consecuencia de la prolongada activación de los receptores a aminoácidos excitadores (Choi et al. 1988). Además, muchos estudios han demostrado que los antagonistas de los receptores glutamatérgicos tanto de tipo NMDA como no-NMDA, evitan la muerte asociada a la hipoxia/isquemia y a la hipoglicemia (Simon et al. 1984; Foster et al. 1988; Wieloch et al. 1985; McCulloch et al. 1991). Asimismo, se ha encontrado que la interrupción de la inervación glutamatérgica a la región isquémica, evita el daño neuronal (Benveniste et al. 1989).

### **Excitotoxicidad y el estado energético celular**

Los principales recursos de energía en el sistema nervioso son el oxígeno y la glucosa. Durante condiciones de hipoxia/isquemia la interrupción de la irrigación sanguínea cerebral produce un estrés metabólico debido a la falta de ATP generado a través de la fosforilación a nivel de sustrato de la glicólisis, y a la fosforilación oxidativa. Cuando los requerimientos de glucosa no se satisfacen debido a la hipoglicemia o a la isquemia cerebral, se produce la muerte de las neuronas posiblemente como consecuencia de la combinación de dos factores: 1) la deficiencia energética debida no sólo a la falta de flujo sanguíneo, sino posiblemente también a la alteración permanente de la actividad del transporte de electrones mitocondrial (Allen et al. 1995; Zaidan y Sims, 1994; Canevari et al. 1997); 2) al aumento en los niveles extracelulares de los aminoácidos excitadores, glutamato y aspartato (Benveniste et al. 1984). Las causas de este

aumento en las concentraciones extracelulares de estos aminoácidos no se conocen, pero se piensa que puede deberse a un funcionamiento deficiente o inverso de sus transportadores, que son dependientes de energía (Rossi et al. 2000).

Desde hace tiempo, se ha reconocido la importancia de la relación que existe entre los efectos tóxicos del glutamato y el estado energético de la célula (Novelli et al. 1998; Henneberry, 1989; Beal, 1993; Schinder et al. 1996). En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha mostrado que la toxicidad del glutamato y sus análogos se exagera en presencia de inhibidores metabólicos (Novelli et al. 1998; Greene y Grenamyre, 1995; Sánchez-Carbante y Massieu, 1999; García y Massieu, 2001; Massieu et al, 2002; Massieu et al., 2003). Estudios *in vitro* en retina de pollo han mostrado que la inhibición simultánea de la glicólisis y la cadena transportadora de electrones da lugar a la muerte neuronal, que puede prevenirse con antagonistas del receptor glutamatérgico de tipo NMDA (Zeevalk y Nicklas, 1990). En condiciones de deficiencia energética, la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  es inhibida, colapsando el gradiente iónico membranar, provocando a su vez la despolarización de la membrana y la pérdida del bloqueo del receptor NMDA por el  $\text{Mg}^{2+}$ . Esto permite la activación de estos receptores a concentraciones fisiológicas de glutamato extracelular. El proceso de muerte neuronal producido en estas condiciones se ha denominado excitotoxicidad secundaria (Novelli et al. 1988; Zeevalk y Nicklas, 1992) (Fig. 4). Algunos experimentos sugieren que el daño neuronal irreversible producido por el glutamato o sus análogos se debe a la falla mitocondrial (Ankarcrona et al. 1995;

Schinder et al. 1996; Budd y Nichols, 1996), y que la muerte neuronal producida por inhibidores de la cadena respiratoria y de la glicólisis se produce por un mecanismo excitotóxico (Storey et al. 1992; Pang y Geddes, 1997; Zeevalk y Nicklas, 1990). Lo anterior apoya la estrecha relación entre el estado energético celular y la muerte excitotóxica.

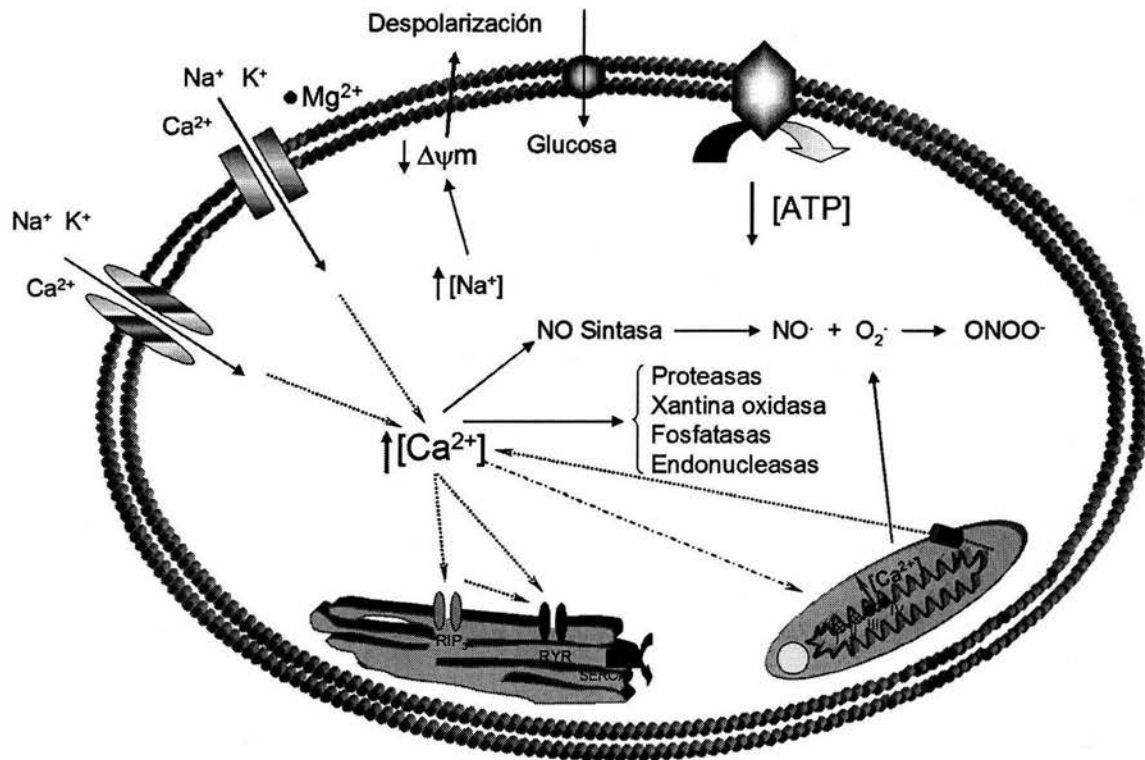


Figura 4. Mecanismos celulares involucrados en la muerte inducida por excitotoxicidad secundaria. En condiciones de deficiencia energética, la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  es inhibida, colapsando el gradiente iónico membranar, provocando a su vez la despolarización de la membrana y la pérdida del bloqueo del receptor NMDA por el  $\text{Mg}^{2+}$ . Esto permite la activación de estos receptores a bajas concentraciones de glutamato extracelular, y un incremento de calcio intracelular. Este incremento de calcio intracelular activa una serie de enzimas como proteasas, fosfatasa, endonucleasas y óxido nítrico sintasa. El óxido nítrico ( $\text{NO} \cdot$ ) y el súper óxido ( $\text{O}_2 \cdot$ ) producen daño membranar por lipoperoxidación.

## La enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenas

La enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) es una de las enzimas participantes en la glicólisis. En algunos estudios se ha reportado la participación de esta enzima, en enfermedades neurodegenerativas, como la Corea de Huntington donde se ha observado que la proteína huntingtina se une a la GADPH (Burke et al. 1996), lo cual sugiere una disminución en su actividad (Roses, 1996). Además, la GADPH puede unirse al dominio citoplasmático de la proteína precursora amiloide (Shulze et al. 1992), involucrada en la formación de placas amiloideas en pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

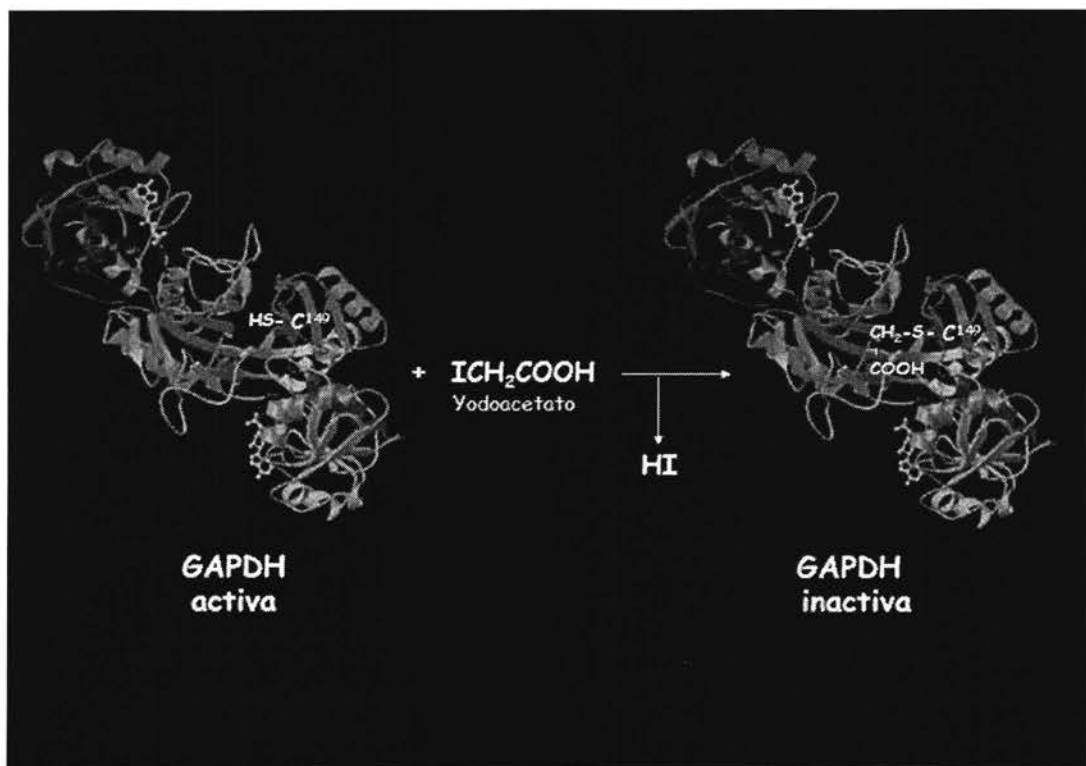


Figura 5. Inhibición de la GADPH por la unión covalente del yodoacetato al sulfidrilo de la cisteína 149 del sitio activo de la enzima.

La administración de yodoacetato, que es un inhibidor irreversible de la enzima glicolítica, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, se utiliza frecuentemente para interrumpir la vía glicolítica. El yodoacetato inhibe a la enzima uniéndose de manera covalente a un grupo sulfidrilo localizado en su sitio activo (Fig. 5). En condiciones normales *in vivo*, la glicólisis contribuye solamente con el 5% de la producción de energía en las neuronas, pero es una fuente importante de precursores del ciclo de Krebs y de la fosforilación oxidativa. Como se mencionó anteriormente, la inhibición de la glicólisis *in vitro* en la retina exacerba el daño neuronal producido por el glutamato. En un estudio realizado por Uto (1995) en cultivos de células hipocampales de la región CA1 y de corteza cerebral, la presencia de 1 o 10 mM de KCN y arsenato (que inhiben el metabolismo aeróbico), produce una reducción en la sobrevivencia del 50 %. En tanto que, las mismas concentraciones de yodoacetato producen la muerte de la totalidad de las células. Recientemente, Matthews et al. (1997) demostraron que la administración de yodoacetato directamente en el estriado de la rata produce muerte neuronal y sugiere que ésta puede ser de tipo excitotóxico. Además, experimentos de microdiálisis *in vivo* han mostrado que la inhibición de la glicólisis con yodoacetato produce la elevación de los niveles extracelulares de aspartato y glutamato, lo cual podría dar lugar a la muerte neuronal (Sanderg et al. 1985; Massieu et al. 2000). La administración *in vivo* de 5 mM de yodoacetato induce un incremento de 3.5 veces y de 35 veces de los niveles extracelulares de glutamato y aspartato, respectivamente, y se acompaña de muerte neuronal en la región CA1 y en el giro dentado del hipocampo (Massieu et al., 2000).

Diversos estudios *in vitro* han mostrado que el yodoacetato induce la liberación de glutamato y aspartato aparentemente a través del funcionamiento inverso de sus transportadores (Madl y Burgesser, 1993; Gemba et al., 1994; Ogata et al., 1995; Longuemare y Swanson, 1995). Sin embargo otros estudios han sugerido que otros mecanismos participan en la muerte inducida por yodoacetato, y que ésta no se previene con antagonistas de los receptores a glutamato, pero sí con antioxidantes (Uto et al. 1995; Malcolm et al, 2000). Por lo que no está del todo claro si la muerte inducida por la inhibición glicolítica involucra un mecanismo excitotóxico.

### **Calcio intracelular y la muerte excitotóxica**

El calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular participa como segundo mensajero en la regulación de una gran variedad de procesos celulares como son la excitabilidad, contracción muscular, liberación de neurotransmisores, plasticidad sináptica, expresión de genes durante el desarrollo y diferenciación. La generación de señales de  $\text{Ca}^{2+}$  esta determinada por la interacción entre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de compartimentos intracelulares, su unión a proteínas de amortiguamiento de calcio citoplasmático y la subsiguiente remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol por la extrusión transmembranal de  $\text{Ca}^{2+}$  o su secuestro por organelos intracelulares. La concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es 10 000 veces menor que la extracelular, siendo 100 nM y 1 mM, respectivamente (Kostyuk and Verkhratsky, 1994). Este gradiente de concentración es mantenido por la relativa impermeabilidad de la membrana plasmática al  $\text{Ca}^{2+}$  y por la presencia de

ATP, la generación de especies reactivas de oxígeno, y eventualmente con un cambio transitorio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, contribuyendo todo esto al daño neuronal irreversible (Ankarcona et al., 1995; Budd and Nicholls, 1996; Schinder et al., 1996; Satter et al., 1998). Estas observaciones sugieren que la integridad del funcionamiento mitocondrial es muy importante en el mantenimiento de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y por tanto en la sobrevivencia de las células después de un evento tóxico. Una de las evidencias de la participación de la mitocondria en la desregulación del  $\text{Ca}^{2+}$  y la muerte neuronal, es que la ciclosporina A (CsA), que inhibe la apertura del poro de transición mitocondrial, previene la muerte en diferentes modelos de isquemia transitoria (Kuroda et al., 1999; Uchino et al., 1995; Yoshimoto y Siesjö, 1999), de excitotoxicidad (Schinder et al., 1996; Ruiz et al., 2000) y de privación de oxígeno y glucosa (Seaton et al., 1998; Fiskum et al., 1999). La mayoría de los trabajos enfocados a dilucidar los mecanismos implicados en la desregulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se centran en la mitocondria, mientras que se ha prestado menor atención a la participación del retículo endoplásmico en la muerte neuronal excitotóxica (Paschen y Doutheil, 1999; Mattson et al., 2000).

### *Retículo endoplásmico*

El retículo endoplásmico (RE) es uno de los principales organelos intracelulares. Está formado por una red de cisternas y túbulos (Meldolesi, 2001) y ocupa una parte sustancial (>10 %) del volumen celular. El RE controla la síntesis de proteínas, así como, su procesamiento post-traduccional y genera una gran variedad de señales hacia el núcleo a través de proteínas unidas a  $\text{Ca}^{2+}$

(Verkhatsky y Petersen, 2002). Al mismo tiempo, el RE es reconocido como un importante organelo de señalización. Particularmente importante para la función de las neuronas es la habilidad del RE de actuar como un reservorio dinámico de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que es capaz de acumular activamente  $\text{Ca}^{2+}$  y liberarlo en respuesta a estímulos fisiológicos (Verkhatsky, 2002). La fisiología molecular del RE como almacén de  $\text{Ca}^{2+}$  esta sustentada por varias familias de proteínas localizadas en las endomembranas, así como dentro de su lumen. Las proteínas más importantes son la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  del tipo ATPasa del retículo sarco(endoplásmico) (SERCA), canales liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  y proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  intraluminal, muchas de las cuales sirven como enzimas reguladores de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En condiciones de reposo la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el lumen del RE es considerablemente más alta (10 - 100  $\mu\text{M}$ ) que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma (100 - 300 nM). Este gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  es mantenido por la SERCA. El RE cuenta también con dos canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , el receptor a inositol-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y el receptor a rianodina (Ry) (Mattson et al., 2000) (Fig. 6).

### *La SERCA*

Las células co-expresan bombas de calcio en la membrana y en el retículo endoplásmico. La proteína de la bomba SERCA consiste de una sola cadena polipéptidica (~ 1000 aminoácidos) dividida en cuatro dominios. Hasta el momento se han descrito tres diferentes genes que expresan la SERCA en mamíferos. Al parecer la SERCA1 se encuentra localizada casi exclusivamente en músculo



esquelético rápido, mientras que la SERCA2 y SERCA3 (Pozzan et al., 1994) se expresan ampliamente en varios tejidos. La SERCA1 presenta dos isoformas: la SERCA1a que se expresa en adultos y la SERCA1b en la etapa neonatal. La proteína SERCA2 también posee dos isoformas: SERCA2a la cual esta predominantemente expresada en músculo cardiaco, liso, en fibras de músculo esquelético lento y en neuronas de Purkinje del cerebelo y la SERCA2b predominantemente expresada en el cerebro (Kostyuk y Verkhratsky, 1994). La SERCA3 es el miembro recién descubierto de la familia de las SERCA. Se han descrito cinco isoformas (SERCA3a-e) de ésta bomba en células humanas, posiblemente producto del corte y empalme alternativo del RNAm (Wuytack et al., 2002).

Las bombas SERCA son diferencialmente reguladas en el citosol por  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico e intraluminal: el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico activa el bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$  al RE, mientras que el incremento en el contenido luminal de  $\text{Ca}^{2+}$  libre inhibe la SERCA. La SERCA es efectiva y selectivamente bloqueada por tapsigargina a concentraciones nanomolares y por el ácido ciclopiazónico a concentraciones micromolares (Kostyuk y Verkhratsky, 1994).

### *El receptor a $\text{IP}_3$*

La estimulación del receptor a  $\text{IP}_3$  resulta en movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares, las cuales son activadas por muchos procesos celulares, como neuromodulación, plasticidad sináptica y percepción sensorial (Berridge, 1993). El receptor a  $\text{IP}_3$  es activado por  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{IP}_3$ , el cual es el producto de la hidrólisis del

fosfolípido 4,5-bifosfato fosfatidil-inositol ( $\text{PIP}_2$ ). El receptor a  $\text{IP}_3$  es un tetrámero de cuatro cadenas polipeptídicas, cada una con un peso molecular cercano a 300 kDa (Bilmen y Michelangeli, 2002). Cada subunidad tiene un sitio de unión al  $\text{IP}_3$ . Hay tres diferentes isoformas del receptor a  $\text{IP}_3$  codificados por tres diferentes genes ( $\text{RIP}_{31}$ ,  $\text{RIP}_{32}$  y  $\text{RIP}_{33}$ ). Las tres isoformas presentan una activación bifásica por el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, activándose a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  cercana a 300 nM, pero inhibiéndose a concentraciones más bajas o más altas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Taylor y Laude, 2002). El receptor de  $\text{IP}_3$  también es regulado por otros mecanismos, como fosforilaciones y ATP (Taylor et al., 1999). En el cerebro y el cerebelo se expresa abundantemente el receptores a  $\text{IP}_3$ , casi exclusivamente la isoforma  $\text{RIP}_{31}$ .

Inicialmente la heparina era la única herramienta farmacológica para inhibir la actividad del receptor a  $\text{IP}_3$ , pero contaba con muchas limitantes, como baja afinidad, poca selectividad, impermeabilidad en la membrana plasmática (Gafni et al., 1997), y estimulación de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vía receptores a rianodina (Bezprozvanny et al., 1993). Recientemente se ha utilizado a la xestospongina C (XeC), un fármaco obtenido de una esponja australiana de la especie *Xestospongina*. Este fármaco ha mostrado un potente efecto bloqueador de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por  $\text{IP}_3$  en vesículas de retículo endoplásmico de cerebelo de conejo (Gafni et al., 1997).

### *El receptor a rianodina*

La liberación de calcio por la activación del receptor a rianodina (Ry) se realiza por un mecanismo de retroalimentación positiva denominado liberación de calcio inducida por calcio (LCIC). La actividad del receptor a rianodina puede ser modulada por muchas sustancias, incluyendo reguladores endógenos y exógenos. Los primeros agrupan iones ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , fosfato inorgánico), nucleótidos de adenina (AMP, ADP y ATP), adenosina difosfato ribosa cíclica (ADPRc), calmodulina, fosforilación por proteína cinasa A (PKA) y proteína cinasa C (PKC), oxidación y agentes reductores. Los reguladores exógenos son representados por diferentes agentes farmacológicos, que incluyen a la rianodina, la cafeína, el halotano y el rojo de rutenio (Rossi y Sorrentino, 2002) (Fig. 6).

Al igual que el receptor a  $\text{IP}_3$ , el receptor a rianodina es un tetrámero de cuatro subunidades monoméricas de >400 kDa (Smith y Nahorski, 1993). El receptor a rianodina está codificado por una familia de genes que se expresan principalmente en músculo esquelético, corazón y cerebro (Palnitkar et al., 1997). Tres diferentes isoformas del receptor a rianodina han sido identificados en tejido de mamíferos: el RRY1, el cual es predominantemente expresado en músculo esquelético; el RRY2, que se expresa predominantemente en músculo cardiaco y el RRY3, el cual es expresado en diferentes tejidos, en los cuales se incluye el cerebro (Zhao et al., 2001). El RRY1 se expresa en las células de Purkinje del cerebelo y el RRY2 se expresa ampliamente en el cerebro (Rosa et al., 1997).

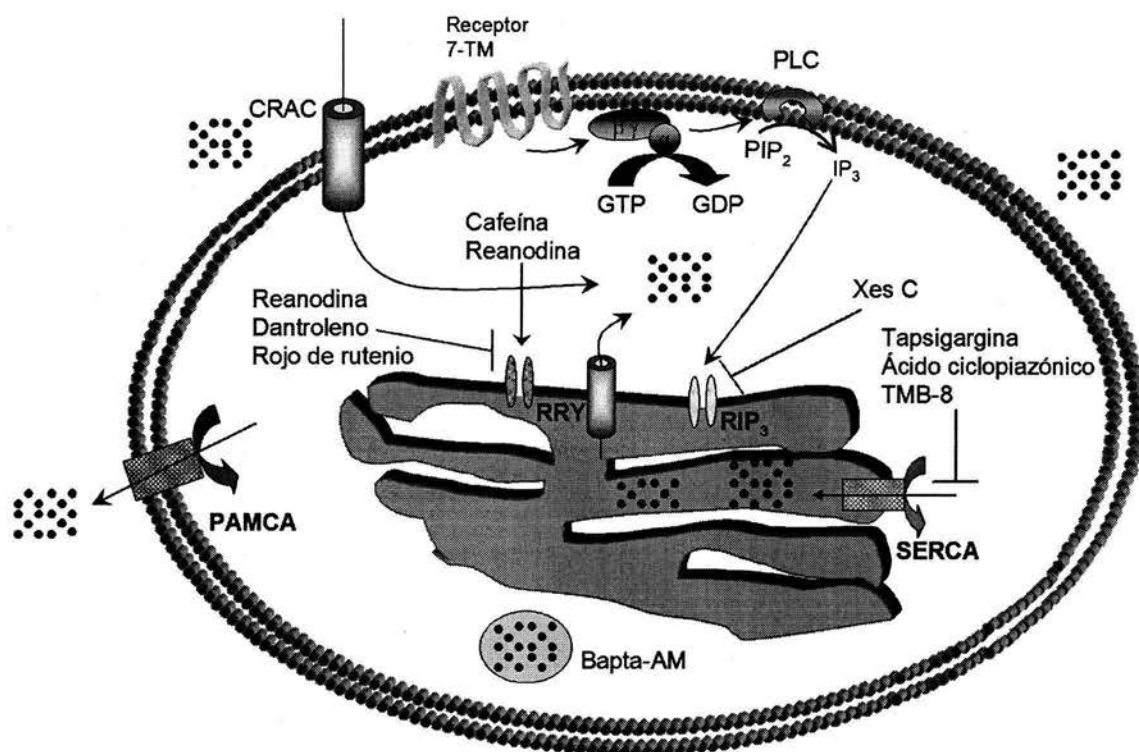


Figura 6. Mecanismos de regulación del calcio intracelular. El RE cuenta con estructuras capaces de almacenar (SERCA) y liberar  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (receptores a rianodina y receptores a  $\text{IP}_3$ ), así como mecanismos membranales de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  (PAMCA). La activación de receptores metabotrópicos promueve la formación de  $\text{IP}_3$  vía activación de la PLC por las proteínas G. El  $\text{IP}_3$  activa al  $\text{RIP}_3$  el cual es inhibido por la xestospongina C (Xes C). El receptor a rianodina es activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , cafeína y rianodina (nM) e inhibido por rianodina ( $< 10 \mu\text{M}$ ), dantroleno y rojo de rutenio. De la misma manera hay mecanismos de almacenamiento (SERCA) y extrusión membranales (PAMCA) de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de energía. La SERCA es inhibida por la tapsigargina, ácido ciclopiazónico y TMB-8.

El dantroleno es un relajante muscular que se utiliza clínicamente para tratar la hipertermia maligna, inhibiendo la liberación de calcio del retículo endoplásmico a través de la inhibición de los receptores a rianodina (Nakayama et al., 2002). El dantroleno actúa selectivamente sobre el RRY1 y el RRY3, pero no tiene efecto sobre el RRY2 (O'Connell et al., 2002; Zhao et al., 2001)

## Participación del RE en la muerte excitotóxica

El papel del calcio en procesos patológicos que culminan en la muerte neuronal como hipoxia/isquemia, hipoglicemia severa y epilepsia fue propuesto hace más de 22 años (Siesjö, 1981). Una de las primeras estrategias utilizadas para bloquear la toxicidad inducida por el incremento en el calcio citoplásmico fue incubar a las células con Bapta-AM, un quelante de calcio. El Bapta-AM previene *in vitro* la toxicidad inducida por glutamato e *in vivo* el daño inducido por isquemia cerebral transitoria (Tymianski et al., 1994; Tymiansky, 1995), apoyando la participación del incremento en el calcio citoplásmico en el desarrollo de la muerte neuronal.

Se ha observado *in vitro* que en condiciones de privación de oxígeno y glucosa se presente vaciamiento de las pozas de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE por activación de los receptores a rianodina (Pisan et al., 2000), sugiriendo que la disminución de calcio de las pozas del RE esta implicado en la muerte neuronal (Paschen, 1999, 2000). Varios estudios muestran que el dantroleno, un fármaco selectivo para bloquear al receptor a rianodina, puede proteger contra la muerte inducida por glutamato y por isquemia (Frandsen y Schousboe, 1992, 1993; Zhang et al., 1993; Weih y Perry, 1996). Por otra parte, la activación de los receptores de glutamato de tipo metabotrópico, que da lugar a la liberación de calcio del retículo endoplásmico a través de receptores a  $\text{IP}_3$ , induce o agrava el daño neuronal excitotóxico *in vivo* (Camón et al., 1998), mientras que algunos antagonistas de receptores metabotrópicos glutamatérgicos pueden prevenirla (Opitz y Reymann,

1991). Además, la tapsigargina, que inhibe a la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico y por tanto aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, puede producir muerte apoptótica en diversos tipos celulares (Takadera y Ohyashiki, 1998). Estos estudios sugieren que la regulación de la liberación del calcio intracelular del retículo endoplásmico puede jugar un papel importante en la muerte neuronal. Sin embargo, la contribución del RE a la desregulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducida por glutamato no está del todo esclarecida, ni tampoco se conoce si el almacenamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  en pozas intracelulares se altera durante la deficiencia energética. Es predecible que las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico y de la membrana plasmática, se inactiven durante la inhibición metabólica, y por ende contribuyan a la pérdida de la homeostasis de calcio y a la muerte neuronal. Por otra parte, no se conoce si la liberación de calcio del retículo endoplásmico puede originar la sobre carga de calcio mitocondrial y su disfunción.

En estudios previos del laboratorio se ha mostrado que la toxicidad del glutamato se exagera tanto en presencia de venenos mitocondriales como de yodoacetato (Sánchez-Carbente y Massieu, 1999; Massieu et al., 2000; García y Massieu, 2001; Massieu et al, 2002). Es muy posible que en el caso de las toxinas mitocondriales exista una desregulación del calcio debida a la disfunción mitocondrial como se ha sugerido previamente (Ankarcrona et al., 1995; Schinder et al., 1996). En cambio, no se conoce si la inhibición glicolítica, da lugar a la pérdida de la homeostasis de calcio intracelular, y si la participación de pozas intracelulares está involucrada en este proceso y en el de muerte neuronal producida por deficiencia energética.

En el presente trabajo nos planteamos conocer por medio de estudios farmacológicos, sí los mecanismos a través de los cuales la inhibición de la glicólisis produce muerte neuronal involucran:

1. La disminución de los niveles de ATP,
2. La liberación de aminoácidos excitadores,
3. La activación de receptores a glutamato y
4. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares.

## HIPÓTESIS

---

La inhibición de la glicólisis inducida por yodoacetato produce muerte neuronal por un mecanismo que involucra la liberación de aminoácidos excitadores, la disminución en los niveles de ATP y la desregulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares del retículo endoplásmico, en neuronas de hipocampo de rata.



## OBJETIVO GENERAL

---

Estudiar si la muerte neuronal producida por la inhibición de la glicólisis inducida por yodoacetato, involucra la liberación de aminoácidos excitadores, la activación de receptores a glutamato, la disminución en los niveles de ATP y la desregulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

- Estudiar la liberación de aminoácidos excitadores al medio extracelular en cultivos de hipocampo en condiciones de inhibición glicolítica.
- Estudiar si la muerte neuronal inducida por yodoacetato se puede prevenir con antagonistas de los receptores a glutamato.
- Estudiar si en cultivos de hipocampo hay cambios en los niveles de ATP intracelular después del tratamiento con yodoacetato.
- Estudiar si la muerte neuronal inducida por yodoacetato puede ser prevenida por el suministro de sustratos energéticos.
- Estudiar si la muerte neuronal inducida por yodoacetato se exagera en presencia de agentes capaces de liberar calcio de pozas intracelulares.
- Estudiar si la muerte neuronal inducida por yodoacetato se previene en presencia de agentes que inhiben la liberación de calcio intracelular.

## METODOLOGÍA

---

### Cultivos de hipocampo

Los cultivos de hipocampo se obtuvieron a partir de tejido fetal de ratas Wistar de 17 días de gestación siguiendo la técnica reportada por Mynlieff (1997), con algunas modificaciones. Brevemente, después de realizada la disección de los hipocampos, estos fueron cortados en un rebanador automatizado en cubos de 300  $\mu\text{m}$  e incubados en una solución con tripsina al 0.25 % y dispersados por trituración en una solución con DNAsa al 0.08 % e inhibidor de tripsina al 0.52 %. Las células fueron suspendidas en medio Neurobasal, pH 7.4, suplementado con B27, glutamina (0.5 mM), glutamato (25  $\mu\text{M}$ ) y gentamicina (0.02 mg/ml), y sembradas a una densidad de  $394 \times 10^3/\text{cm}^2$  ( $7.5 \times 10^5$  células/0.5 ml/pozo) en cajas de plástico 24 pozos (Cambridge, MA, EUA) previamente tratadas con poli-L-lisina (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 24 horas. Las células fueron cultivadas por 8 días *in vitro* (DIV) a 37° C en una atmósfera humificada y saturada con 5% de  $\text{CO}_2$ / 95% de  $\text{O}_2$ . Glucosa (5 mM) y citosina arabinosa (10  $\mu\text{M}$ ) fueron adicionadas a los 4 DIV.

La población neuronal y de astrocitos en estos cultivos fue determinada a los 8 DIV por inmunohistoquímica usando anticuerpos contra la proteína asociada a microtúbulos (MAP-2, por sus siglas en inglés) y contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés), marcadores de neuronas y células gliales respectivamente. Típicamente se obtuvieron proporciones en los cultivos de 95 % de neuronas y 5 % de células gliales

## Tratamientos farmacológicos

Después de 8 DIV los cultivos de neuronas de hipocampo fueron tratados con yodoacetato (IOA) (1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) para obtener una curva dosis respuesta de su efecto sobre la viabilidad neuronal.

### *Agonistas y antagonistas de la liberación de calcio del RE*

Una vez determinada la curva dosis-respuesta se eligió la dosis de 50  $\mu\text{M}$ , que causa aproximadamente 50% de muerte para combinarla con los fármacos que inhiben la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, como: el Bapta-AM (10  $\mu\text{M}$ ), el dantroleno (25  $\mu\text{M}$ ), la rianodina (25  $\mu\text{M}$ ) y la xetospongina C (2  $\mu\text{M}$ ). De la misma manera se utilizó una dosis de 25  $\mu\text{M}$  de yodoacetato para combinarla con la tapsigargina (100 nM), el ácido ciclopiazónico (10  $\mu\text{M}$ ), el TMB-8 (10  $\mu\text{M}$ ), la cafeína (5 mM) y la rianodina (1  $\mu\text{M}$ ), con el fin de exacerbar la muerte inducida por el yodoacetato. Los fármacos se incubaron en 500  $\mu\text{l}$  de medio Ringer Krebs que contiene (en mM) NaCl 154, KCl 5.6, CaCl 2.3,  $\text{NaHCO}_3$  3.6, glucosa 5.6, HEPES 5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2, pH 7.4 El yodoacetato se incubó durante 30 min en ausencia o presencia de los fármacos. Algunos de estos fueron añadidos antes o después del tratamiento con yodoacetato (ver tabla 1).

### *Sustratos energéticos y antagonistas de receptores a glutamato.*

En otro tipo de experimentos se determinó el efecto protector de sustratos energéticos (piruvato y acetoacetato) y de antagonistas de receptores a glutamato (MK-801 y NBQX) sobre la muerte neuronal. Para esto, los cultivos fueron

expuestos a yodoacetato (50  $\mu\text{M}$ ) en presencia o ausencia de piruvato (2 mM), acetoacetato (5 mM), MK-801 (10  $\mu\text{M}$ ) y NBQX (50  $\mu\text{M}$ ). Una vez retirado el yodoacetato los sustratos energéticos y los antagonistas a glutamato fueron añadidos durante las 23.5 h subsiguientes.

Tabla 1. Tratamientos farmacológicos. Los cultivos fueron tratados durante 30 min con yodoacetato en presencia o ausencia de diferentes fármacos. Algunos fármacos se adicionaron antes y después del tratamiento con yodoacetato.

	Pre-tratamiento		Tratamiento		Post-tratamiento	
	[ $\mu\text{M}$ ]	Tiempo (H)	[ $\mu\text{M}$ ]	Tiempo (H)	[ $\mu\text{M}$ ]	Tiempo (H)
Yodoacetato			50	0.5		
+ Bapta-AM	10	0.25	10	0.5		
+ Dantroleno	25	0.5	25	0.5		
+ Cafeína			5000	0.5	5000	23.5
+ Rianodina			1 y 10	0.5	1 y 10	23.5
Yodoacetato			25	0.5		
+ Tapsigargina			0.1 y 0.2	0.5	0.1 y 0.2	23.5
+Ac. ciclopiazónico			10	0.5	10	23.5
+ TMB-8			50	0.5	50	23.5
+ Xes C			2	0.5		

Después de 30 minutos de exposición al IOA, se aspiró el medio y se reemplazó por el medio de cultivo que se había retirado previamente. Después de 24 h de incubación, la inspección visual fue seguida por la cuantificación de la muerte neuronal a través de la reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), (veáse más abajo)

### **Evaluación de la muerte neuronal en los cultivos**

Para evaluar la muerte neuronal en los cultivos se utilizó la técnica de reducción de MTT. Esta técnica valora la actividad de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales en células vivas. El ensayo se basa en la capacidad de las enzimas mitocondriales de transformar la sal de MTT en sal de formazán, que es un producto insoluble azul violeta (Berridge y Tan, 1993), a través del corte del anillo de tetrazolium del MTT por las deshidrogenasas mitocondriales en células vivas. La disminución en la formación de formazán es un índice de la pérdida de la actividad mitocondrial y por lo tanto del daño celular.

Después del tratamiento experimental los cultivos se incubaron con MTT (100  $\mu$ M) a 37° C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub> durante 1 h. Posteriormente se aspiró el medio y se agregó isopropanol para solubilizar la sal de formazán. El producto azul-violeta de la sal de formazán fue cuantificado a 570 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control.

## **Determinación de los niveles de ATP**

La determinación de los niveles de ATP intracelular se realizó por medio de un método quimioluminiscente que contiene luciferasa y su sustrato luciferina (Molecular Probes). La luciferasa requiere de ATP para producir luz, que en presencia de  $Mg^{2+}$  cataliza la reacción entre la luciferina, el ATP y el oxígeno para producir oxiluciferasa, AMP,  $CO_2$ , pirofosfato y luz (560 nm).

Los niveles de ATP fueron determinados a 1, 4, 6, 8 y 24 h después de 30 min de exposición a yodoacetato en presencia y ausencia de acetoacetato (5 mM) y piruvato (2 mM). La determinación de ATP se realizó siguiendo la técnica previamente reportada por Marcaida y colaboradores (1997). Brevemente, las células fueron lavadas dos veces con una solución Locke's (pH 7.4) previamente calentada, que contiene (mM): NaCl 154, KCl 5.6,  $NaHCO_3$  3.6,  $CaCl_2$  2.3, HEPES 5, glucosa 5.6, y el ATP fue extraído por lisis con un buffer liberador de ATP (sigma). El lisado fue colocado en un tubo eppendorf y sonicado. 15  $\mu$ l del homogenado fueron diluídos en 85  $\mu$ l de agua destilada, y los 100  $\mu$ l fueron colocados en un tubo de polietileno y colocados en un luminómetro. El luminómetro inyectó 400  $\mu$ l de una mezcla de reacción de luciferin-luciferasa. El ATP fue medido durante 20 s en los cuales se determinó el pico máximo de la reacción (usualmente 5 segundos después de iniciada la reacción). Los valores de quimioluminiscencia obtenidos por el luminómetro en milivolts y la concentración de ATP, fueron calculados a partir de los registros obtenidos de una curva estándar de ATP (de 6.15 – 250 pmol). A partir del mismo homogenado que se utilizó para

determinar los niveles de ATP, se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford y los datos se expresaron como pmol/ $\mu$ g de proteína.

### **Determinación de la concentración de aminoácidos excitadores en el medio extracelular**

Los niveles de glutamato y aspartato presentes en el medio fueron medidos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés). 0.5 y 3.5 h después del periodo de incubación con el yodoacetato. Se tomaron alícuotas del medio que se desproteinizaron con ácido perclórico al 7% y fueron posteriormente neutralizadas con KOH. Se tomaron 20  $\mu$ l y se mezclaron con el mismo volumen de o-phthaldialdehído y después de 3 minutos se inyectaron 20  $\mu$ l en el sistema HPLC (Waters). Se utilizó una columna ODS (25 cm x 4 mm de diámetro interno, Supelco, Inc). La fase móvil estuvo constituida de metanol:acetonitrilo:isopropanol:buffer de fosfatos (60 mM, pH 6.65)/buffer de fosfatos (60 mM, pH 6.65), a 10 y 90%, respectivamente, a un flujo de 1 ml/min. Los resultados fueron comparados con estándares de concentraciones conocidas de aminoácidos, procesados de la misma manera. Los datos se expresan como pmolas/ $\mu$ g de proteína.

### **Materiales**

Tripsina, DNAasa, gentamicina, L-glutamina, glutamato, poli-L-lisina, citosina arabinosa, yodoacetato, dantroleno, xestospondina C y MTT se obtuvieron de Sigma-RBI (St. Louis, MO, USA). Inhibidor de tripsina, Medio Neurobasal y



suplemento B27 (Minus AO) obtenidos de Gibco/Life Technologies (Rockville, MD, USA). Cafeína, rianodina, TMB-8, ácido ciclopiazónico y bapta-AM obtenidos de Alomone Labs. (Jerusalem, Israel).

### **Estadística**

Los datos fueron analizados estadísticamente con una prueba de ANOVA, seguida por una prueba post hoc de Fisher's de comparación múltiple.

## RESULTADOS

---

### ***La muerte inducida por la inhibición glicolítica es dependiente de concentración de yodoacetato.***

Los primeros experimentos consistieron en la realización de una curva dosis-respuesta de toxicidad. La toxicidad del yodoacetato fue determinada por el método de MTT 24 h después de incubar los cultivos de hipocampo durante 30 min en medio Ringer Krebs con diferentes concentraciones de yodoacetato (5 - 100  $\mu\text{M}$ ). En la figura 7A, se observa el daño dependiente de la concentración del yodoacetato, y concuerdan con resultados previamente reportados (Izumi et al., 1998 y Malcolm et al., 2000). De acuerdo a la curva dosis-respuesta, la disminución en la reducción de MTT es significativa a partir de 25  $\mu\text{M}$  de yodoacetato (~ 30 %). A 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  se observa una reducción en la sobrevivencia del 50 y 80 %, respectivamente (Fig. 7A). A partir de los datos obtenidos en la curva dosis respuesta, se eligió la dosis de 50  $\mu\text{M}$  para los subsecuentes experimentos.

De igual forma, se llevaron a cabo experimentos para estudiar el curso temporal de la muerte inducida por el yodoacetato (50  $\mu\text{M}$ ), con el propósito de conocer el tiempo en el que comienza el proceso de muerte. Las células fueron incubadas durante 0.5 h con yodoacetato y se midió la viabilidad por medio de la reducción de MTT a diferentes tiempos (1, 4, 6, 8, 12 y 24 horas). En la figura 7B, se observa que a partir de la primera hora posterior al tratamiento con el

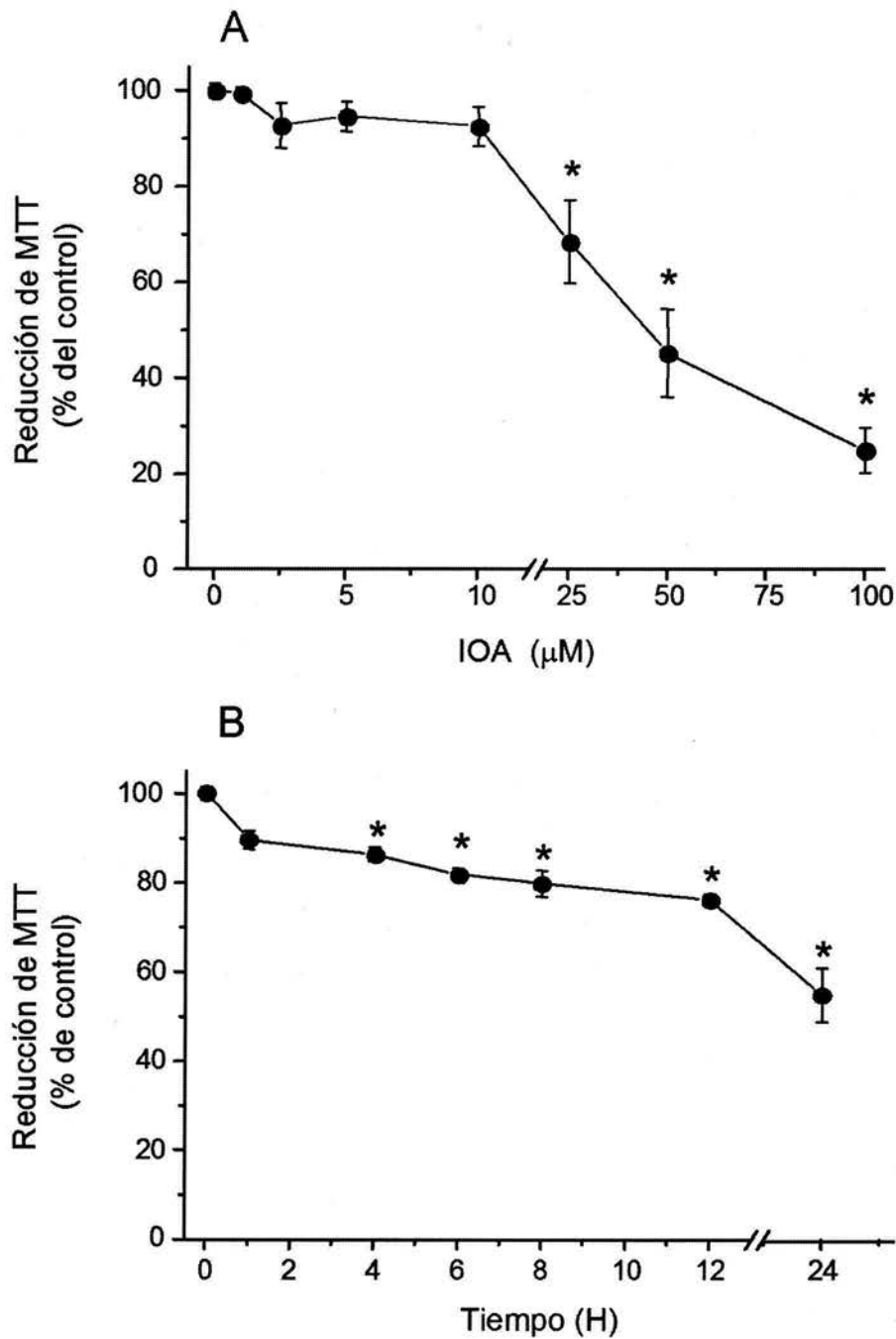


Figura 7. Curva dosis-respuesta de la toxicidad del yodoacetato (IOA) en cultivos de neuronas de hipocampo (A) y curso temporal de la muerte inducida por yodoacetato (50  $\mu\text{M}$ ) (B). Las células fueron tratadas durante 30 min con yodoacetato (a la concentración indicada) en medio Ringer Krebs y la sobrevivencia fue medida 24 h después (A) y a los tiempos indicados (B) por medio del ensayo de reducción de MTT. El control es la condición inicial. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. de cinco experimentos individuales. Los datos fueron analizados con una prueba de ANOVA seguida por una prueba de Fisher. \* $P < 0.05$  relativo al control.

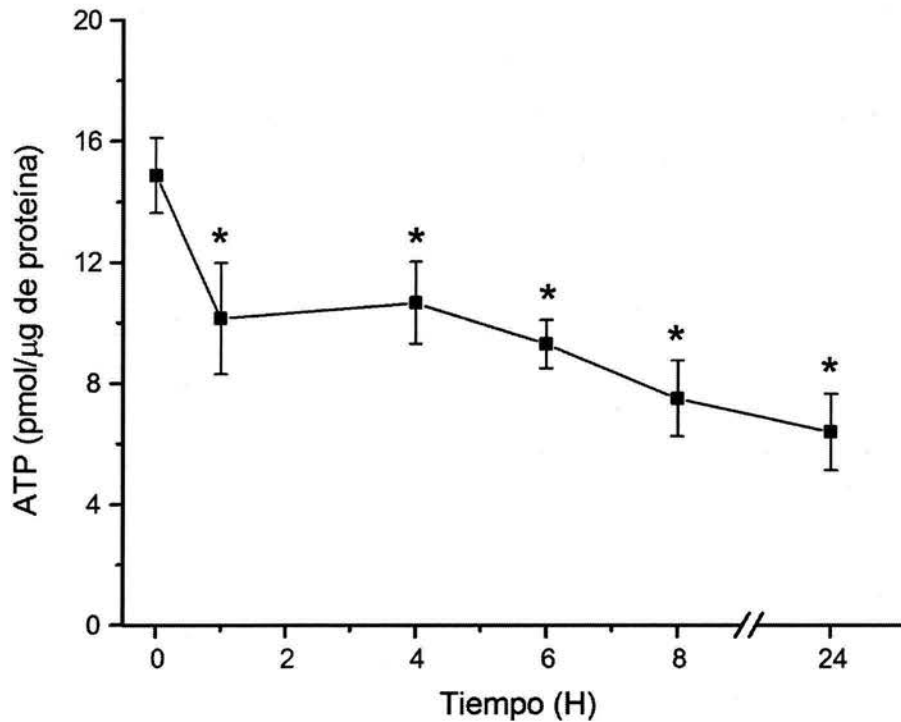


Figura 8. Curso temporal de los cambios en los niveles de ATP inducidos por 30 min de tratamiento con yodoacetato (50  $\mu\text{M}$ ) en neuronas de hipocampo en cultivo. El control es la condición inicial. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. de tres a siete experimentos independientes. Los niveles de ATP fueron determinados por el ensayo de luciferin-luciferasa como se describe en la metodología. Los datos fueron analizados con una prueba de ANOVA seguida por una prueba de Fisher. \* $P < 0.05$  relativo a las células control.

Por esta razón, decidimos probar también el efecto de los sustratos energéticos sobre la muerte neuronal producida por yodoacetato. De la misma manera, se probaron inhibidores de receptores a glutamato, tanto de tipo NMDA (MK-801) como no-NMDA (NBQX) con el fin de estudiar sí el daño producido por el yodoacetato es medido por un mecanismo excitotóxico.

Las neuronas de hipocampo se incubaron durante 30 min con yodoacetato (50  $\mu\text{M}$ ) en medio Ringer Krebs. Posteriormente se retiró el medio y se agregó

medio de cultivo con los antagonistas de los receptores a glutamato, como MK-801 y NBQX, y/o con sustratos energéticos, piruvato y acetoacetato. Estos últimos fueron también coincubados con MK-801 y NBQX.

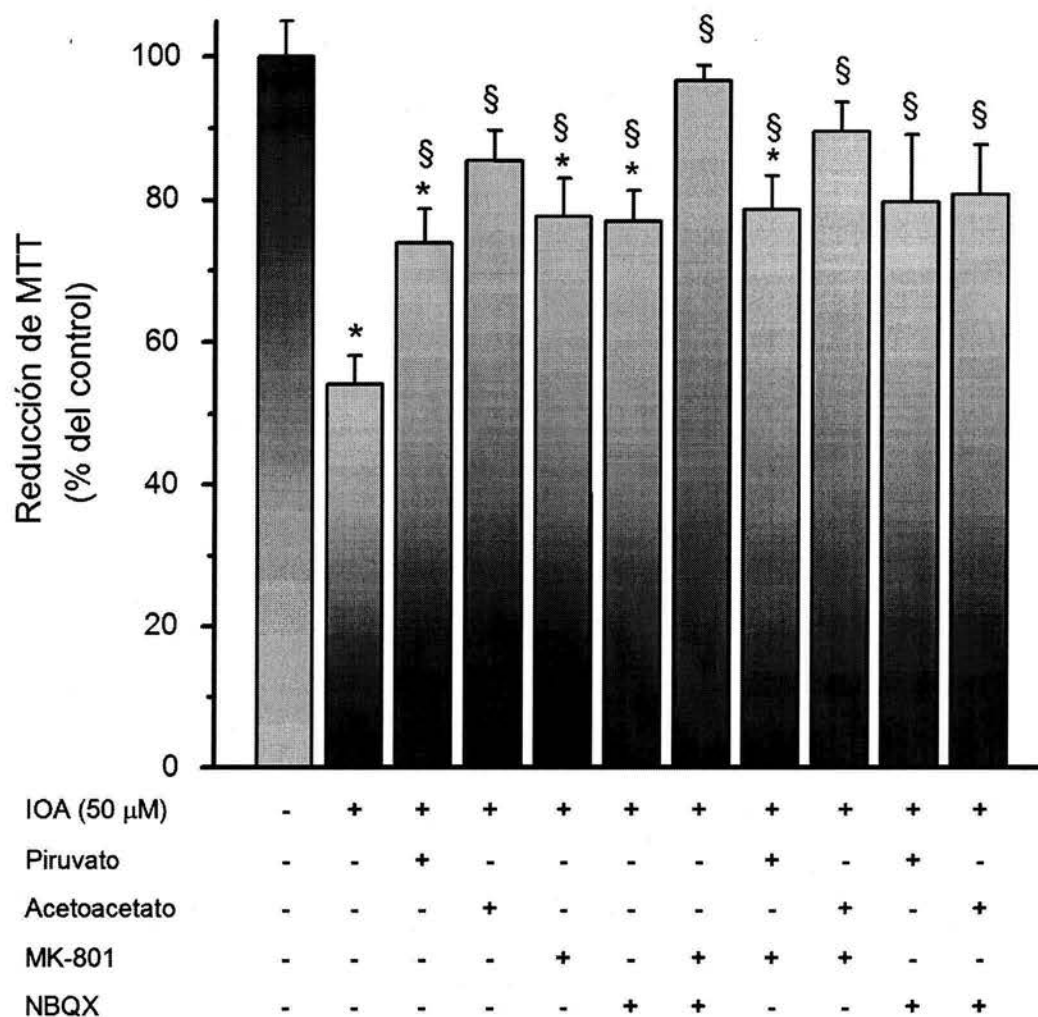


Figura 9. Efecto protector de los sustratos energéticos, acetoacetato (5 mM) y piruvato (2 mM) y de los antagonistas de los receptores a glutamato, MK-801 (10  $\mu$ M) y NBQX (50  $\mu$ M) sobre el daño neuronal inducido por yodoacetato (50  $\mu$ M). Las células fueron expuestas a yodoacetato en medio Ringer Krebs durante 30 min. Posterior a este tiempo el medio Ringer Krebs fue retirado y reemplazado con medio condicionado conteniendo los antagonistas de los receptores a glutamato y los sustratos energéticos. La sobrevivencia fue determinada 24 h después por el ensayo de reducción de MTT. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. de cuatro a diez experimentos individuales. Los datos fueron analizados con una prueba de ANOVA seguida por una prueba de Fisher. \*P<0.05 relativo a las células control, §P<0.05 relativo a las células tratadas con el yodoacetato.

En presencia de yodoacetato (50  $\mu$ M) la capacidad de reducción del MTT disminuyó 50 % con respecto al control. Tanto los sustratos energéticos como los antagonistas de receptores a glutamato tuvieron un efecto protector contra la muerte inducida por yodoacetato (Fig. 9). En presencia de acetoacetato (5 mM) y piruvato (2 mM) la reducción de MTT se restauró hasta un 85 y 73 %, respectivamente, de los niveles control. El antagonista del receptor NMDA (MK-801) y el antagonista de los receptores no-NMDA (NBQX) también previnieron la muerte neuronal restaurando la reducción de MTT hasta un 76 %. La coincubación de los antagonistas de los receptores a glutamato y de los sustratos energéticos no incrementó el efecto individual de estos compuestos sobre la reducción de MTT. La administración simultánea de MK-801 y NBQX logró restablecer por completo la reducción de MTT, este efecto fue estadísticamente significativo con respecto a los tratamientos individuales de MK-801 y NBQX (Fig.9). Este resultado indica que la muerte inducida por el yodoacetato participa un componente de tipo excitotóxico en las neuronas de hipocampo.

En la figura 10 se muestra el efecto protector del acetoacetato y del piruvato en cultivos representativos de hipocampo. Se puede apreciar que los cultivos se encuentran preservados en presencia de acetoacetato y piruvato 24 h después de 30 min de exposición a yodoacetato (comparar las Fig. 10B con 10C y 10D).

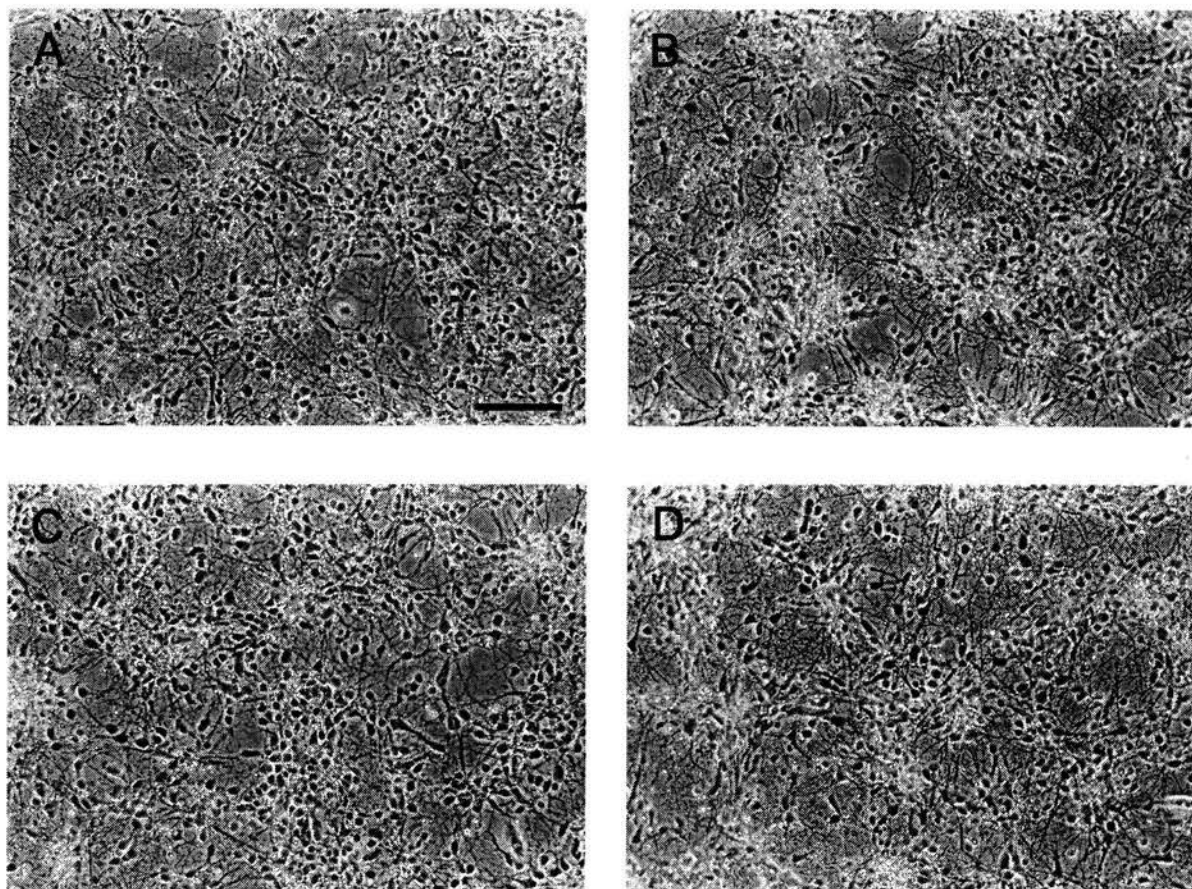


Fig. 10. Efecto tóxico del yodoacetato ( $50 \mu\text{M}$ ) (B) y su protección por acetoacetato ( $5 \text{ mM}$ ) (C) y piruvato ( $2 \text{ mM}$ ) (D) en cultivos de neuronas de hipocampo. Los cultivos tratados con yodoacetato presentan muchas células brillantes y refringentes, lo cual es un indicativo de muerte celular (B). Las células en presencia de acetoacetato (C) y piruvato (D) se muestran mejor preservadas. En el caso del acetoacetato las células se aprecian básicamente idénticas a las células del cultivo control (A). Escala =  $100 \mu\text{M}$ .

Con el fin de estudiar si el efecto protector de los sustratos energéticos es por su capacidad de restablecer los niveles energéticos, se determinaron los niveles de ATP en presencia de piruvato y acetoacetato a diferentes tiempos (1, 4, 6, 8 y 24 h). La presencia de acetoacetato y de piruvato en el medio de cultivo durante las 24 h posteriores a la exposición con yodoacetato ( $50 \mu\text{M}$ ), mostró una tendencia a incrementar la concentración de ATP con respecto al tratamiento con yodoacetato, en todos los tiempos estudiados.

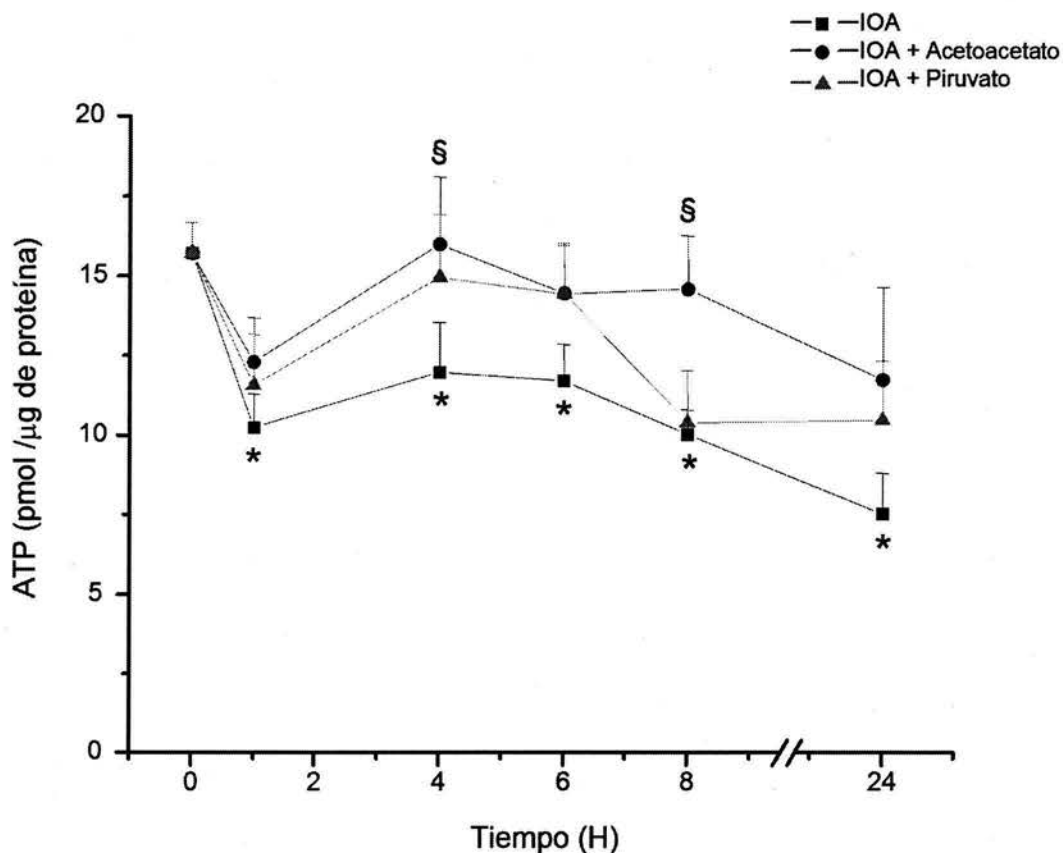


Figura 11. Curso temporal de los cambios en los niveles de ATP inducidos por 30 min de tratamiento con yodoacetato (50  $\mu$ M) en neuronas cultivadas de hipocampo y el efecto de la presencia de acetoacetato (5 mM) y piruvato (2 mM) durante las siguientes 24 h. El control es la condición inicial. Los datos son el promedio  $\pm$  E.S. de tres a siete experimentos independientes. Los niveles de ATP fueron determinados por el ensayo de luciferin-luciferasa como se describe en la metodología. Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA seguida por una prueba de Fisher. \* $P < 0.05$  relativo a las células control.

Este incremento sólo fue estadísticamente significativo en presencia de acetoacetato a las 4 h y 8 h (Fig. 11). Este resultado podría explicar el efecto de los sustratos energéticos sobre la reducción de MTT en presencia de yodoacetato.



***La muerte inducida por inhibición glicolítica es dependiente de calcio.***

Para establecer la participación de las pozas intracelulares de calcio del retículo endoplásmico, y del calcio extracelular en el proceso de muerte inducida por inhibición glicolítica, se utilizaron dos estrategias experimentales. La primera fue mantener baja la concentración de calcio intracelular por medio del Bapta-AM (quelante de calcio intracelular) y la segunda eliminar el calcio del medio extracelular. En la figura 12 se muestra la toxicidad del yodoacetato en neuronas de hipocampo. Tanto el tratamiento con Bapta-AM (10  $\mu\text{M}$ ) en presencia y ausencia de calcio externo, como la ausencia de calcio externo disminuyeron significativamente la toxicidad del yodoacetato (Fig. 12). En la figura 13 se presentan ejemplos de las células observadas en microscopia de contraste de fase. El control muestra los somas celulares oscuros rodeados de un halo translúcido conectados a través de una red de neuritas (Fig. 13A); el efecto tóxico de la exposición a yodoacetato (50  $\mu\text{M}$ ) durante 30 min se muestra en la figura 8B. Los somas celulares se observan encogidos y refringentes. La presencia de neuritas se redujo considerablemente y las que permanecieron se encontraron delgadas y fragmentadas. En presencia del Bapta-AM (Fig. 13C) y con el medio externo libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 13D), la mayoría de las células mantienen su integridad morfológica. A pesar de que el efecto de la ausencia de calcio sobre la morfología celular es muy evidente, ninguno de estos tratamientos restauró completamente la capacidad de la reducción de MTT (Fig. 12). Estos resultados sugieren que la toxicidad del yodoacetato está relacionada con un aumento en la

concentración del calcio intracelular. Lo anterior no descarta la participación de la entrada de calcio por medio de los receptores NMDA.

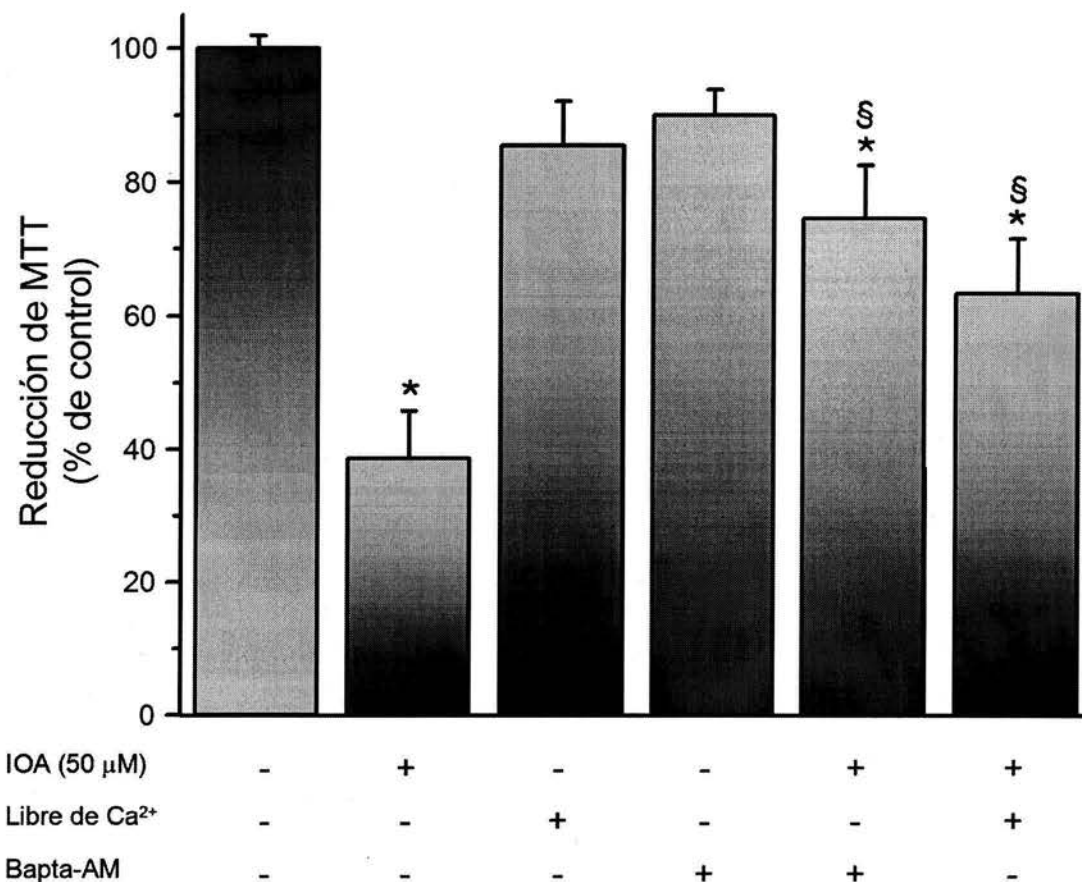


Figura 12. Efecto protector de Bapta-AM (10  $\mu\text{M}$ ) y del medio libre de calcio contra la muerte inducida por 30 min de tratamiento con yodoacetato (50  $\mu\text{M}$ ). Las células fueron preincubadas con Bapta-AM durante 15 min y posteriormente incubadas en medio Ringer conteniendo Bapta-AM ó medio Ringer sin calcio durante la exposición con el yodoacetato. La viabilidad fue medida 24 h después por el ensayo de reducción de MTT. Los datos son promedios  $\pm$  E.S de cuatro a cinco experimentos independientes. Los datos fueron analizados por una prueba ANOVA seguida con una prueba de Fisher. \* $P < 0.05$  relativo a las células control.

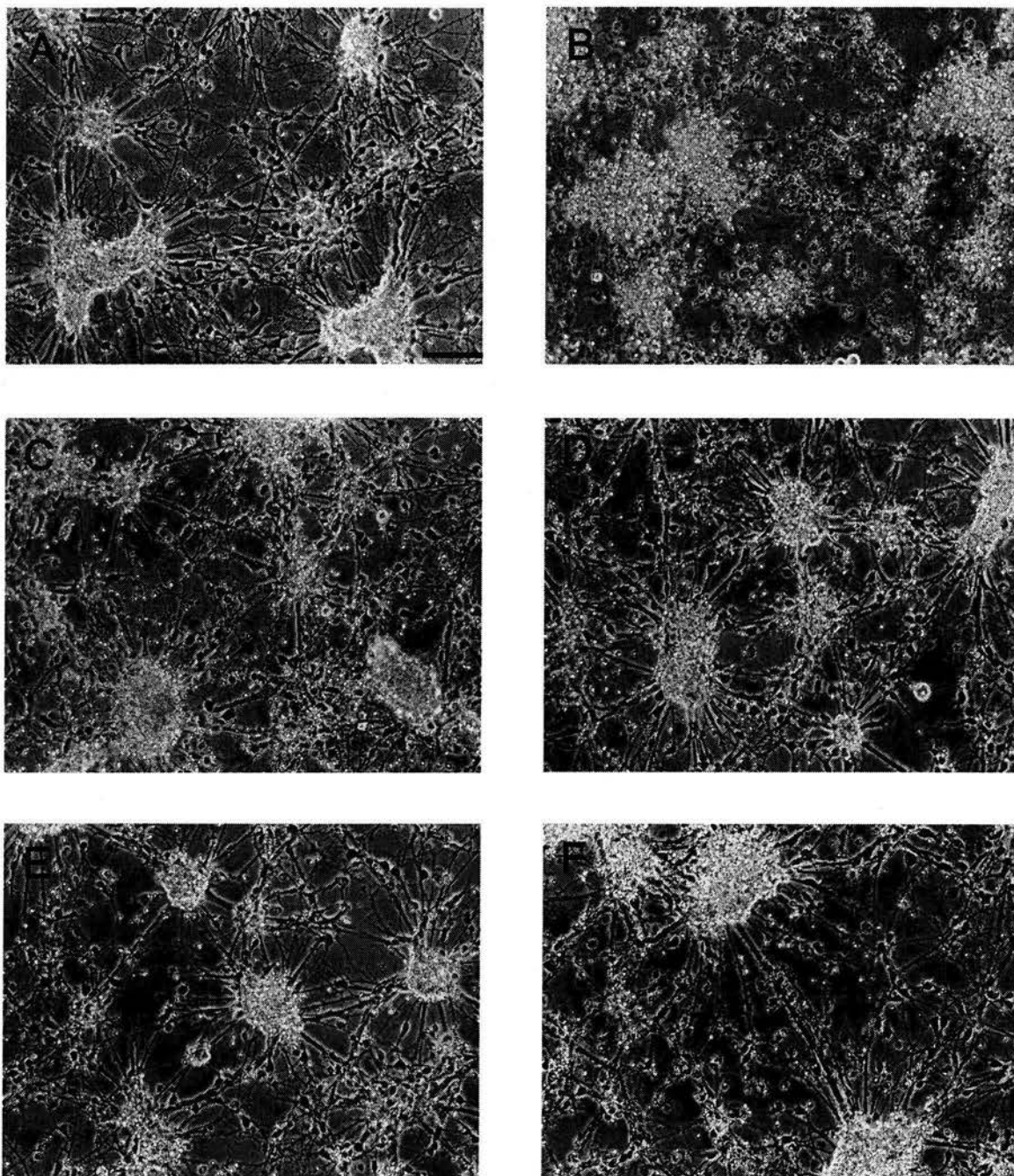


Figura 13. Efecto protector de Bapta-AM (10  $\mu$ M) (C), medio libre de calcio (D), dantroleno (25  $\mu$ M) (E) y XeC (2  $\mu$ M) (F) en cultivos de neuronas de hipocampo. Los cultivos tratados con yodoacetato presentan células brillantes y refringentes, lo cual es un indicativo de muerte celular (B). Las células en presencia de Bapta-AM (C), medio libre de calcio (D), dantroleno (E) y XeC (E) se muestran mejor preservadas. En presencia de dantroleno las células se aprecian semejantes a las células del cultivo control (A). Escala = 100  $\mu$ M.

### ***Participación de la SERCA y de las pozas intracelulares de $Ca^{2+}$ .***

Para estudiar la participación de las pozas intracelulares de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico, decidimos dividir el estudio en varias partes. Primero abordamos el papel de la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico (SERCA) y posteriormente el de los receptores a rianodina y a inositol trifosfato ( $IP_3$ ). En el caso de la SERCA utilizamos varios inhibidores de la misma: la tapsigargina (100 nM), que es un inhibidor irreversible; el ácido ciclopiazónico (10  $\mu$ M) y el TMB-8 (50  $\mu$ M), estos últimos inhibidores reversibles de la SERCA. Con el fin de exacerbar los efectos tóxicos del yodoacetato, en estos experimentos se utilizó una concentración de 25  $\mu$ M de yodoacetato que reduce la sobrevivencia neuronal en un 30%. Los tres inhibidores fueron coincubados durante media hora junto con el yodoacetato (25  $\mu$ M) y administrados durante las 24 h posteriores al tratamiento con yodoacetato, midiéndose la reducción de MTT a este tiempo. La tapsigargina por si sola disminuyó la reducción de MTT en un 40%, pero no así el ácido ciclopiazónico ni el TMB-8. Ninguno de los inhibidores exacerbó la muerte inducida por yodoacetato (Fig. 14). La tapsigargina fue también utilizada con el fin de aumentar la concentración de calcio intracelular antes de la administración del yodoacetato. En este caso esta fue preincubada durante 0.5 h, pero en esta condición no se observó una exacerbación de la muerte inducida por el tratamiento con el yodoacetato (datos no mostrados). Dosis inferiores de tapsigargina (10 y 50 nM) tampoco exacerbaron la muerte (datos no mostrados).

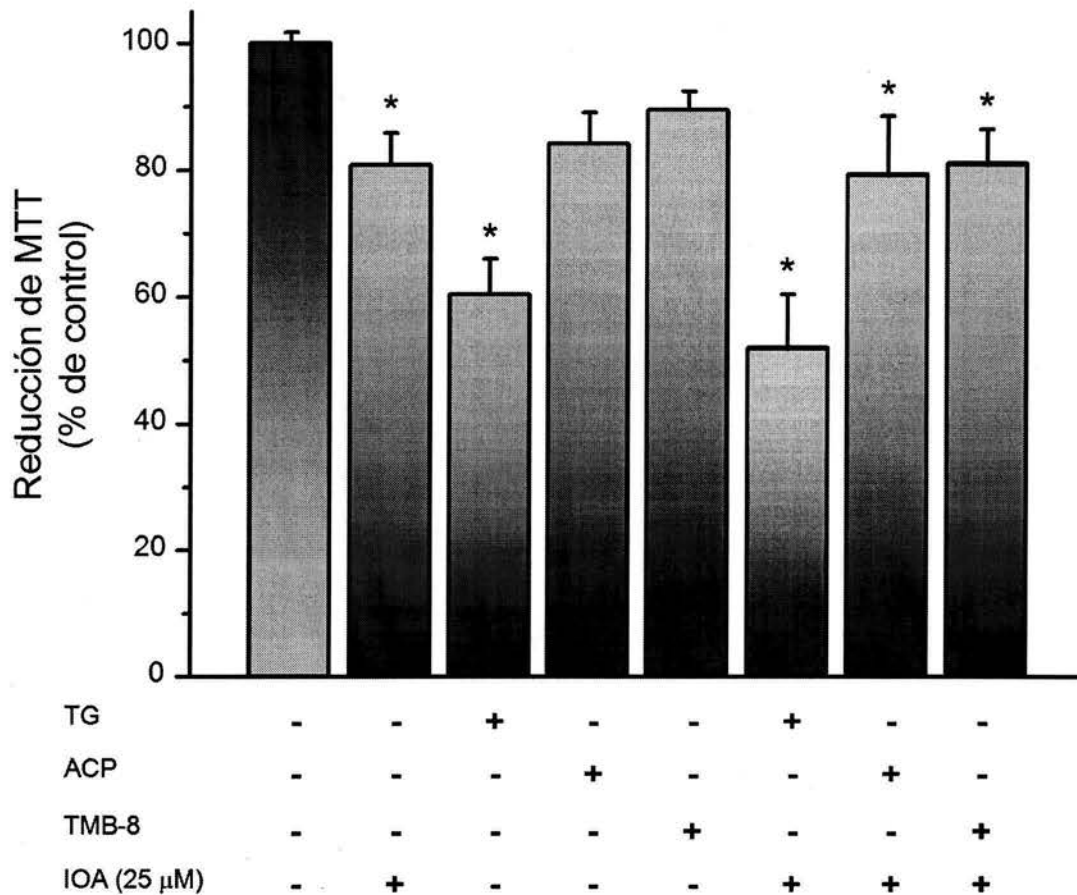


Figura 14. Efecto de inhibidores de la SERCA sobre la muerte inducida por 30 min de exposición a yodoacetato (25 μM). Las células fueron incubadas en medio Ringer conteniendo TG (100 nM), ACP (10 μM) y TMB-8 (10 μM). Posteriormente el medio Ringer fue retirado y reemplazado con medio condicionado en presencia de TG, ACP y TMB-8. La sobrevivencia fue medida 24 h después por el ensayo de reducción de MTT. Los datos son promedios ± E.S de cuatro a seis experimentos independientes. Los datos fueron analizados por una prueba ANOVA seguida con una prueba de Fisher. \*P<0.05 relativo a las células control.

A continuación nos abocamos a estudiar la participación de los receptores a rianodina del retículo endoplásmico, para lo cual se utilizaron agonistas de este receptor, como son: la cafeína y la rianodina, esta última presenta un comportamiento bifásico, ya que a concentraciones pequeñas (100 nM - 1 μM) muestra un efecto de agonista del receptor, y a concentraciones mayores a 10 μM

presenta un efecto antagonista del mismo receptor. Ambos fármacos, tanto la cafeína (5 mM), como la rianodina (1  $\mu$ M) fueron coincubadas durante 30 minutos junto con el yodoacetato (25  $\mu$ M) y durante las 24 h posteriores al tratamiento con el inhibidor glicolítico. Los tratamientos individuales tanto de cafeína como de rianodina redujeron ligeramente la sobrevivencia. La coexposición de yodoacetato y rianodina ó cafeína indujo un mayor porcentaje de muerte que el producido por los tratamientos individuales de yodoacetato, rianodina y cafeína (Fig. 15). La exposición a rianodina a 100 nM no exacerbó la muerte (datos no mostrados).

De la misma manera se probaron una serie de antagonistas tanto del receptor a rianodina como del receptor a  $IP_3$ . Se utilizó dantroleno (25  $\mu$ M), un inhibidor clásico del receptor a rianodina, la rianodina a una concentración (25  $\mu$ M) en la que tiene un efecto de antagonista del receptor y la xestospongina C (XeC). Esta última es una oxaquinolizidina macrocíclica aislada de una especie de esponja australiana del mismo nombre (Gafni et al, 1997; Miyamoto et al, 2000; Ozaki et al, 2002), que presenta un efecto antagonista específico para receptores a  $IP_3$  (Gafni et al, 1997). El dantroleno fue preincubado por 15 min y coincubado junto con el yodoacetato durante 30 min. La rianodina (25  $\mu$ M) fue coincubada junto con el yodoacetato y agregada durante las 24 h posteriores al tratamiento con este último. La XeC fue coincubada junto con el yodoacetato por 30 minutos. Posteriormente se retiró del medio y 24 h después del tratamiento con el yodoacetato se midió la viabilidad celular. El dantroleno, la rianodina y la XeC

previnieron la muerte neuronal restaurando la capacidad de reducción del MTT significativamente.

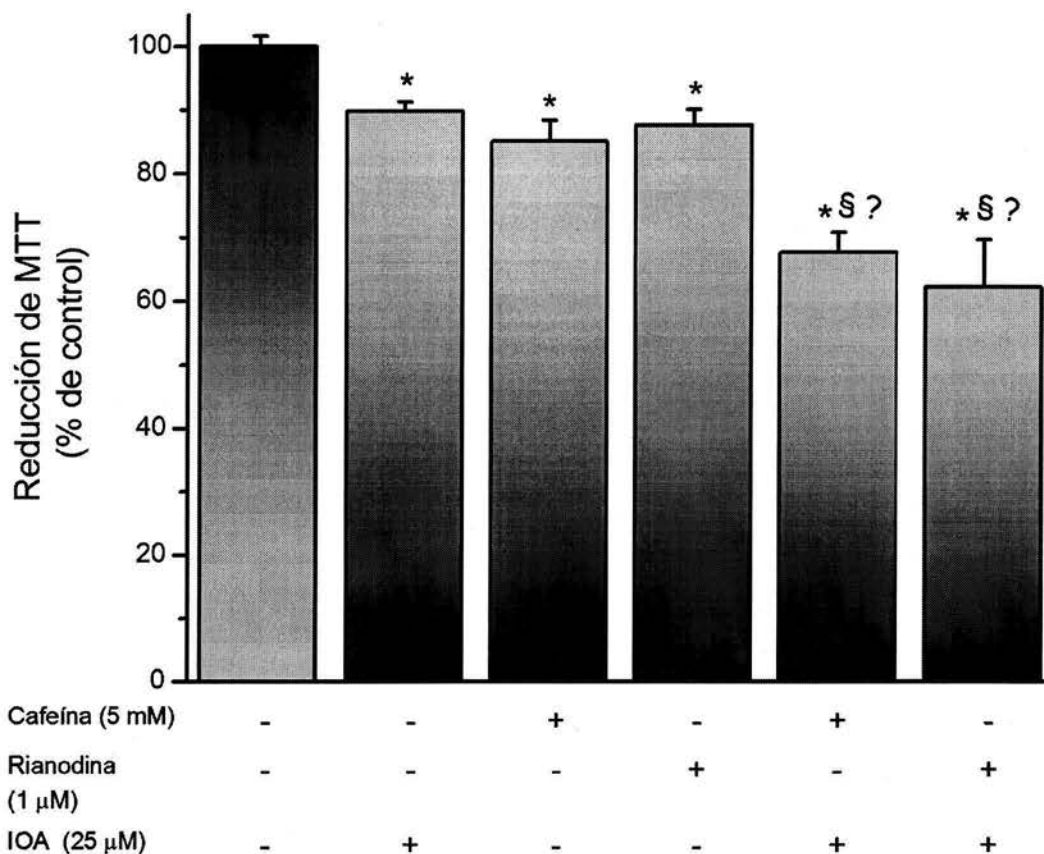
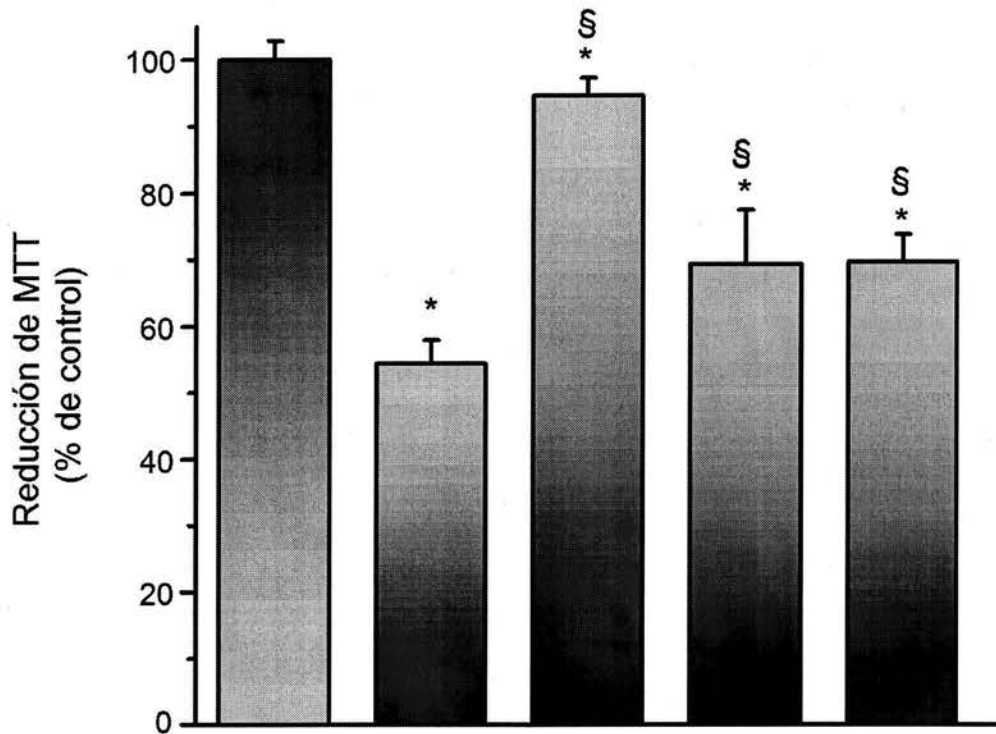


Figura 15. Exacerbación del daño inducido por 30 min de exposición a yodoacetato (50 µM) en presencia de cafeína (5 mM) y rianodina (1 µM). Las células fueron incubadas en medio Ringer conteniendo cafeína y rianodina. Posteriormente el medio Ringer fue retirado y reemplazado con medio condicionado en presencia de cafeína y rianodina. La sobrevivencia fue medida 24 h después por el ensayo de reducción de MTT. Los datos son promedios ± E.S de ocho a diez experimentos independientes. Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA seguida por una prueba de Fisher. \*P<0.05 relativo a las células control, §P<0.05 relativo al tratamiento con yodoacetato y ?P<0.05 relativo al tratamiento con cafeína y rianodina.



Dantroleno (25 μM)	-	-	+	-	-
Rianodina (25 μM)	-	-	-	+	-
XeC (2 μM)	-	-	-	-	+
IOA (50 μM)	-	+	+	+	+

Figura 16. Efecto protector de inhibidores de los receptores a rianodina e  $IP_3$  contra la muerte inducida por 30 min de tratamiento con yodoacetato (50 μM). Las células fueron preincubadas con dantroleno (25 μM) durante 30 min y posteriormente incubadas en medio Ringer conteniendo dantroleno, rianodina (25 μM) y XeC (2 μM). Posteriormente el medio Ringer Krebs se eliminó y se reemplazó por medio condicionado en presencia de dantroleno y rianodina. La viabilidad fue medida 24 h después por el ensayo de reducción de MTT. Los datos son promedios ± E.S de cuatro a nueve experimentos independientes. Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA seguida por una prueba de Fisher. \* $P < 0.05$  relativo a las células control y § $P < 0.05$  relativo al tratamiento con yodoacetato.



El dantroleno fue el más eficiente ya que restauró la reducción de MTT hasta el 87 %. La rianodina y la XeC restauraron la actividad reductora hasta el 70 % (Fig. 16). En la Figura 13 se puede observar el efecto protector del dantroleno (E) y la Xestospongina C (F). En ambas condiciones se aprecia claramente la integridad tanto de los somas como de la red de neuritas.

***Efecto de la inhibición glicolítica en la concentración de aminoácidos extracelulares.***

Con el fin de conocer si el efecto tóxico del yodoacetato está relacionado con un aumento en los niveles extracelulares de aminoácidos excitadores se midió su concentración en el medio extracelular, 0.5 y 3.5 h después de la exposición a yodoacetato. Las células fueron incubadas 0.5 h con el yodoacetato a diferentes concentraciones (5 - 100  $\mu$ M) y a los tiempos ya señalados. Después de 30 min de incubación con el yodoacetato se observó un incremento en los niveles extracelulares de aspartato y glutamato dependiente de la dosis. Este incremento sólo fue significativo en el caso del aspartato cuando se utilizó una concentración de yodoacetato de 100  $\mu$ M (Tabla 2). A las cuatro horas no se presentaron cambios en la concentración extracelular de los aminoácidos (Tabla 3).

Tabla 2. Concentración de aminoácidos (pmol / $\mu$ g de proteína  $\pm$  E.S.) en el medio determinados 0.5 h después de 30 min de exposición a diferentes concentraciones de yodoacetato.

	IOA ( $\mu$ M)					
	0	5	10	25	50	100
Aspartato	0.75 $\pm$ 0.12	0.90 $\pm$ 0.14	0.49 $\pm$ 0.09	0.75 $\pm$ 0.18	1.14 $\pm$ .11	1.27 $\pm$ 0.15*
Glutamato	0.72 $\pm$ 0.14	0.61 $\pm$ 0.11	0.75 $\pm$ 0.27	0.63 $\pm$ 0.12	0.83 $\pm$ 0.10	0.87 $\pm$ 0.16
Glutamina	4.53 $\pm$ 0.79	4.49 $\pm$ 0.99	5.29 $\pm$ 1.65	5.16 $\pm$ 1.29	4.28 $\pm$ 0.96	4.44 $\pm$ 1.18
Glicina	33.58 $\pm$ 5.59	28.17 $\pm$ 6.95	33.304 $\pm$ 8.68	35.87 $\pm$ 5.99	29.42 $\pm$ 3.27	31.98 $\pm$ 3.71
Taurina	7.52 $\pm$ 1.05	7.60 $\pm$ 1.41	7.238 $\pm$ 1.30	7.55 $\pm$ 1.26	6.06 $\pm$ 0.42	6.381 $\pm$ 0.46
Alanina	9.42 $\pm$ 2.92	3.32 $\pm$ 1.5	7.38 $\pm$ 2.92	8.42 $\pm$ 3.23	6.42 $\pm$ 3.87	6.83 $\pm$ 4.03
GABA	0.24 $\pm$ 0.06	0.06 $\pm$ 0.01	0.157 $\pm$ .05	0.13 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.3	0.15 $\pm$ 0.03

Tabla 3. Concentración de aminoácidos (pmol / $\mu$ g de proteína  $\pm$  E.S.) en el medio extracelular determinados 3.5 h después de 30 min de exposición a diferentes concentraciones de yodoacetato.

	IOA ( $\mu$ M)					
	0	5	10	25	50	100
Aspartato	1.29 $\pm$ 0.28	1.47 $\pm$ 0.26	1.47 $\pm$ 0.26	0.59 $\pm$ 0.09	1.34 $\pm$ 0.16	1.33 $\pm$ 0.26
Glutamato	4.17 $\pm$ 0.58	3.98 $\pm$ 0.43	3.82 $\pm$ 0.59	2.80 $\pm$ 0.72	4.19 $\pm$ 1.18	3.80 $\pm$ 0.508
Glutamina	56.24 $\pm$ 7.82	43.20 $\pm$ 1.41	47.09 $\pm$ 2.00	31.65 $\pm$ 4.69*	45.86 $\pm$ 5.66	39.97 $\pm$ 1.76*
Glicina	33.58 $\pm$ 5.59	28.17 $\pm$ 6.95	33.30 $\pm$ 8.68	35.87 $\pm$ 5.99	29.42 $\pm$ 3.27	31.98 $\pm$ 3.71
Taurina	126.10 $\pm$ 25.3	98.57 $\pm$ 14.9	101.66 $\pm$ 10.0	101.66 $\pm$ 10.0	92.06 $\pm$ 4.93	90.00 $\pm$ 8.69
GABA	12.58 $\pm$ 1.49	14.37 $\pm$ 1.43	15.68 $\pm$ 1.04	10.23 $\pm$ 0.71	16.69 $\pm$ 2.09	14.00 $\pm$ 1.52

## DISCUSIÓN

---

Los resultados presentados en este trabajo pueden ser divididos en dos partes, en la primera parte observamos que la muerte inducida por inhibición glicolítica es dependiente de la concentración de yodoacetato y que se desarrolla lentamente después de la exposición al mismo. Además se observó que la muerte neuronal puede ser prevenida por sustratos energéticos, a través de la inducción de un aumento en los niveles de ATP y por antagonistas de receptores glutamatérgicos, sugiriendo la participación de un mecanismo excitotóxico. La segunda parte, el trabajo se centra en estudiar la participación de las pozas intracelulares de calcio en el proceso de muerte inducido por la inhibición glicolítica.

### ***La muerte inducida por la inhibición glicolítica es un proceso lento y dependiente de la concentración***

El presente estudio muestra que la muerte inducida por el yodoacetato es dependiente de la concentración. Este resultado concuerda con un estudio realizado por Malcolm et al. (2000) en cultivos de células granulares de cerebelo en donde encontraron que la neurotoxicidad inducida por yodoacetato es dependiente de la dosis, pero a diferencia de nuestros resultados ellos obtuvieron un 50 % de muerte a una concentración de 10  $\mu$ M de yodoacetato, mientras que nosotros tenemos este porcentaje de muerte a una concentración

de 50  $\mu\text{M}$ . Esto podría indicar diferencias en la utilización de la vía glicolítica en los distintos tipos neuronales.

De la misma manera, se muestra que la muerte inducida por inhibición glicolítica es un proceso lento que se desarrolla en el transcurso de 24 h después de la exposición al yodoacetato. Este resultado indica que el proceso de muerte inducido por el yodoacetato requiere de tiempo y que esto podría deberse a que la disminución de ATP es progresiva.

### ***La inhibición glicolítica disminuyó los niveles de ATP***

En el presente trabajo se encontró que la administración de yodoacetato a neuronas en cultivo reduce significativamente ( $\sim 30\%$ ) los niveles de ATP a los 30 min después del tratamiento con el inhibidor glicolítico, y a las 24 h posteriores al tratamiento observamos una disminución del 50 %. Este resultado concuerda con la disminución en los niveles de ATP ( $\sim 90\%$ ) a las 24 h después de 5 min de tratamiento agudo con yodoacetato 100  $\mu\text{M}$  en cultivos de neuronas de hipocampo (Uto et al., 1995). Estudios previos han mostrado que la administración de glutamato por sí misma puede reducir los niveles de ATP o potenciar la reducción inducida por la inhibición de la fosforilación oxidativa por el ácido 3- nitropropiónico (3-NP) (Ankarcrona et al., 1995; Budd y Nicholls, 1996; Pang y Geddes, 1997). Se ha observado que el incremento en la vulnerabilidad a la toxicidad del glutamato durante condiciones de deficiencia energética, puede estar dado por una desregulación

de calcio iniciada después de la activación del receptor a glutamato, una falla en los mecanismos de extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$ , una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , una despolarización mitocondrial y una eventual apertura del poro de transición de la permeabilidad (Ankarcrona et al., 1995; Budd y Nicholls, 1996; Schinder et al., 1996; White y Reynolds, 1996). La administración intrahipocampal de yodoacetato reduce significativamente los niveles de ATP y produce daño neuronal 24 h después de su administración (Massieu et al., 2003; Massieu et al., 2000). La muerte celular puede estar relacionada con un mecanismo mediado por glutamato, ya que la concentración de glutamato y particularmente de aspartato, se incrementa en el espacio extracelular durante la administración intracerebral de yodoacetato (Sandberg et al., 1985; Massieu et al., 2000).

***Efecto protector de sustratos energéticos y de antagonistas de receptores a glutamato.***

En el presente trabajo se evaluó la capacidad del piruvato y del acetoacetato como posibles neuroprotectores contra el daño inducido por la inhibición glicolítica. La administración de piruvato y de acetoacetato previene significativamente el daño inducido por la administración de yodoacetato (50  $\mu\text{M}$ ) durante 30 min. Esta protección correlaciona con el mantenimiento de los niveles de ATP cercanos al control. Se ha visto que el piruvato puede preservar la función sináptica y la integridad morfológica de las neuronas en rebanadas de hipocampo en condiciones de ausencia de glucosa y durante la inhibición

glicolítica (Izumi et al., 1997), así como prevenir el daño inducido por glutamato (Ruiz et al., 1998) y por NMDA en ausencia de glucosa (Maus et al., 1999) en cultivos de neuronas corticales y de estriado, respectivamente, por un proceso que implica la producción de ATP, un incremento en la tasa de respiración aeróbica y una disminución en la concentración del calcio citosólico (Villalba et al., 1994; Eimerl y Schramm, 1995; Maus et al., 1999). De la misma manera en nuestro laboratorio hemos observado que la administración de piruvato previene la muerte inducida por glutamato en condiciones de deficiencia energética (García y Massieu, 2001). Además se ha propuesto que el efecto protector del piruvato puede deberse a su capacidad de reaccionar con el  $H_2O_2$  para formar acetato, agua y dióxido de carbono, disminuyendo así su concentración (Desagher et al., 1997). Asimismo, se ha propuesto que el efecto protector de los cuerpos cetónicos podría estar relacionado con la disminución en la producción de radicales libres mitocondriales, ya que se ha observado que estos presentan la capacidad de disminuir la forma reducida de la coenzima Q, la cual es el principal origen de radicales libres (superóxido) mitocondriales (Dugan y Choi, 1999). Además el metabolismo de los cuerpos cetónicos reduce al NADP libre, favoreciendo la reducción del glutatión y promoviendo la degradación enzimática del  $H_2O_2$  por la reacción de la glutatión peroxidasa (Veech et al., 2001). *In vivo* se ha demostrado que los sustratos energéticos, piruvato y acetoacetato pueden proteger contra el daño inducido por glutamato en un modelo de inhibición glicolítica (Massieu et al., 2000; 2003).

La muerte celular que se observa en condiciones de inhibición glicolítica es aparentemente excitotóxica debido a que el MK-801 y el NBQX la previenen eficientemente. Este resultado concuerda con los reportados en retina de pollo donde el daño neuronal inducido por inhibición glicolítica es prevenido por MK-801 (Zeevalk y Nicklas, 1990; 1992). En estudios realizados en cultivos de hipocampo de CA1 y en cultivos de células granulares de cerebelo, el MK-801 no tuvo un efecto protector sobre la muerte inducida por yodoacetato (100  $\mu$ M), mientras que la administración de diferentes antioxidantes (vitamina E, trolox, hidroxitolueno butilado y U83836E) mostró un efecto neuroprotector. Estos resultados han llevado a sugerir que el mecanismo de muerte inducido por la administración de yodoacetato no es de tipo excitotóxica, sino que el daño está mediado por la producción de radicales libres (Uto et al., 1995; Malcolm et al., 2000). Esta diferencia en el efecto del MK-801 posiblemente se debe a las concentraciones de yodoacetato utilizados en ambos estudios, ya que la administración de yodoacetato (100  $\mu$ M) en nuestros cultivos de hipocampo induce una mayor muerte celular (90 %), y una disminución más significativa en los niveles de ATP, posiblemente debido a que involucra mecanismos adicionales (Fig. 1A). En un estudio paralelo, los cultivos fueron tratados con dos dosis de yodoacetato (50 y 100  $\mu$ M), observándose que a concentraciones de 100  $\mu$ M de yodoacetato, la muerte es prevenida significativamente con la administración de vitamina E y en menor magnitud por el tratamiento con MK-801, mientras que con la dosis de 50  $\mu$ M el daño neuronal es prevenido eficientemente con MK-801 y con vitamina E. Lo anterior indica que cuando las

células son expuestas a una deficiencia energética muy aguda (100  $\mu$ M de yodoacetato) el mecanismo de muerte preponderantemente es la generación de estrés oxidativo, mientras que si las neuronas son expuestas a condiciones de deficiencia energética parcial (50  $\mu$ M de yodoacetato), el mecanismo de muerte puede ser de tipo excitotóxico.

### ***Efecto de los sustratos energéticos en los niveles de ATP***

En presencia de acetoacetato y de piruvato los niveles de ATP tienden a incrementarse, siendo este incremento significativo sólo en el caso del acetoacetato a las 4 y 8 h. Posiblemente no observamos un aumento en la concentración de ATP en todos los tiempos, debido a que el ATP que se sintetiza puede ser utilizado rápidamente para mantener funcionales a las ATPasas y todos los sistemas celulares que requieren de energía. Estos resultados sugieren que el efecto protector del acetoacetato podría estar relacionado con la restauración de los niveles de ATP durante la inhibición glicolítica. De acuerdo con lo anterior, un estudio reciente de Suzuki et al. (2001) muestra que la administración intraventricular de  $\beta$ -hidroxibutirato (precursor del acetoacetato) previene la disminución de ATP y el edema cerebral en un modelo de isquemia cerebral transitoria. Asimismo, otro trabajo demuestra que la cetosis incrementa la tolerancia a la hipoxia en ratones, a través de la utilización preferencial de los cuerpos cetónicos en el cerebro en estas condiciones (Krisch y D'Alesy, 1984). Además, recientemente, un estudio *in vitro* muestra que el  $\beta$ -hidroxibutirato restaura la actividad sináptica y



preserva la integridad morfológica de las células después de un periodo de privación de glucosa o inhibición glicolítica en rebanadas de hipocampo de ratas inmaduras (Izumi et al., 1998).

Nuestros resultados y los trabajos antes descritos muestran que los sustratos energéticos, piruvato y acetoacetato pueden ser una fuente energética alternativa durante un estado de estrés energético, como en la hipoxia/isquemia, hipoglicemia e inhibición glicolítica.

***El daño neuronal inducido por inhibición glicolítica es dependiente de calcio.***

Muchos trabajos sugieren que un evento crítico en la muerte neuronal inducida por isquemia y otras condiciones patológicas, es la disrupción de la homeostasis del calcio (Choi, 1995; Kristián y Siesjo, 1998; Orrenius y Nicotera, 1994). Inicialmente se planteaba que en la isquemia el evento inicial era una excesiva entrada de calcio intracelular, derivado de la activación de los receptores a glutamato (Siesjö y Bengtsson, 1989). Más recientemente se ha propuesto que la disrupción de la homeostasis de calcio de pozas intracelulares (particularmente el RE), contribuye al daño neuronal en la isquemia y en otros estados patológicos (Paschen, 2000; Parchen y Doutheil, 1999; Wei and Perry, 1996). En el presente trabajo se encontró que el calcio participa de forma importante en la muerte neuronal inducida por la inhibición glicolítica, debido a que tanto la ausencia del calcio extracelular, como la presencia de Bapta-AM (quelante de calcio citosólico libre) previnieron

significativamente la muerte neuronal y mantuvieron la integridad morfológica de los cultivos de hipocampo. Tymianski et al. (1993 y 1995) ha mostrado que el Bapta-AM previene el daño inducido por glutamato *in vitro* e *in vivo*. Contrario a esto, en la línea celular, la SH-SY5Y se muestra que el Bapta-AM es tóxico a altas concentraciones, este efecto se debe posiblemente a una alteración en el balance de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los organelos intracelulares (Wang et al., 2002).

***Las pozas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE participan en el mecanismo de muerte inducido por  $\text{Ca}^{2+}$ , excepto la SERCA.***

La tapsigargina, un inhibidor irreversible de la SERCA, ha sido usada como una herramienta experimental en células neuronales y no neuronales para investigar la posible participación de la disfunción del RE en eventos apoptóticos (Parchen y Doutheil, 1999). En este trabajo se inhibió la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico por la SERCA, tratando de incrementar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y depletar las pozas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . En condiciones de inhibición glicolítica no se observó que la SERCA participará en el proceso de muerte, ya que el tratamiento con inhibidores de la SERCA, tapsigargina, ácido ciclopiazónico y TMB-8 (los últimos inhibidores reversibles) no exacerbó la muerte inducida por yodoacetato. Sin embargo, se observó que la tapsigargina fue tóxica en altas concentraciones y durante una exposición prolongada. En un modelo de privación de oxígeno y glucosa, la administración de tapsigargina no incrementó significativamente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Wei y Perry, 1996). Lo anterior podría explicar por qué en condiciones de inhibición

glicolítica, la SERCA no exagera el daño neuronal. Sin embargo, se ha reportado que el tratamiento con taspigargina en diversos tipos celulares incrementa la concentración de calcio e induce muerte apoptótica (Takadera y Ohyashiki, 1998; Wei y Perry, 1996; Parchen y Doutheil, 1999). El vaciamiento de las pozas intracelulares de calcio por taspigargina, ácido ciclopiazónico y BHQ, induce la muerte de la línea neuronal SH-SY5Y (Nguyen et al, 2002). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales la inhibición de la SERCA no modificó el efecto del yodoacetato aunque son necesarios experimentos adicionales para conocer el efecto de esta inhibición sobre la concentración de calcio intracelular.

La inducción de la liberación de calcio por activación del receptor a rianodina del RE por cafeína y rianodina (1  $\mu$ M) exacerbó la muerte inducida por el tratamiento con yodoacetato. El tratamiento con cafeína induce un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en neuronas sensoriales (Hoesch et al. 2002), y en neuronas granulares de cerebelo (Simpson et al. 1996). En cultivos neuronales en condiciones de privación de oxígeno y glucosa se ha observado que el vaciamiento de las pozas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  es causado por la activación de receptores a rianodina, implicando que la sobreactivación de estos receptores participa en el daño neuronal (Pisan et al. 2000).

***La inhibición de la liberación de Ca<sup>2+</sup> por los receptores a rianodina e IP<sub>3</sub> del RE previene la muerte inducida por la inhibición glicolítica.***

El dantroleno, es usado clínicamente desde 1974 para el tratamiento de hipertermia maligna y espasmos musculares, ya que actúa inhibiendo la liberación de Ca<sup>2+</sup> de pozas intracelulares vía receptores a rianodina en el RE (Wei and Perry, 1996). En este trabajo se demuestra la participación de las pozas intracelulares de calcio, debido a que el dantroleno, la rianodina (25 μM) y la XeC, que inhiben la liberación de calcio de los receptores a rianodina e IP<sub>3</sub> del RE, previenen la muerte inducida por inhibición glicolítica. En estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha mostrado que el dantroleno inhibe la elevación de los niveles citosólicos de Ca<sup>2+</sup> y la neurotoxicidad producida por NMDA, glutamato o despolarización por potasio (Bouchelouche et al. 1989; Frandsen y Schousboe; 1991, 1992, 1993; Simpson et al., 1993; Mody and MacDonald, 1995; Gepdiremen et al., 2001). Igualmente, varios estudios *in vivo* han mostrado que el dantroleno presenta un efecto neuroprotector cuando este es administrado intraventricularmente después de un evento isquémico (Zhang et al., 1993; Wei y Perry, 1996; Nakayama et al., 2002). Por otro lado, Kross et al. (1993) no encontró un efecto protector en un modelo de isquemia global, cuando el dantroleno fue administrado sistémicamente, este efecto podría deberse a la utilización de una dosis inadecuada o a la baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica al fármaco. Sin embargo, otro estudio también encontró un efecto neuroprotector en un modelo de hipoxia en ratas inmaduras (Makarewicz et al. 2000). Por otra parte, varios estudios sugieren que el

dantroleno previene la muerte y el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por tapsigargina (Nguyen et al., 2002; Wei y Perry, 1996), por lo que su acción podría no limitarse a los receptores de rianodina.

Además de inhibir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares del RE, se ha propuesto que el dantroleno inhibe la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por el receptor a NMDA, sugiriendo que este fármaco puede inhibir la actividad del receptor a NMDA (Makarewicz et al., 2003). También se ha propuesto que el efecto protector del dantroleno contra la muerte inducida por 3-hidroxicinurena en células PC12 y GT1-7, se debe a que este incrementa la expresión de la proteína Bcl-2 (Wie et al., 2000). Igualmente, se ha sugerido que el dantroleno puede actuar como antioxidante, debido a que en un estudio *in vitro* se encontró que este fármaco presenta un importante poder reductor y actividad de atrapador de radicales libres (Büyükkuroglu et al., 2001). En macrófagos alveolares de rata (Chou et al., 1999) y en la rata *in vivo* (Wu y Yen, 1997) se ha observado que el dantroleno inhibe la actividad de la óxido nítrico sintasa, sugiriendo una actividad antioxidante del dantroleno. Turner et al. (2001) ha reportado que el dantroleno inhibe la liberación de calcio inducida por la microinyección de  $\text{IP}_3$  y por la exposición a ATP en neuronas mientéricas, sugiriendo que este fármaco puede inhibir la actividad tanto de los receptores a rianodina como de los receptores a  $\text{IP}_3$  del RE.

De la misma manera que el dantroleno, la rianodina a una concentración micromolar inhibe el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En

este estudio el efecto protector de la rianodina no fue tan eficiente como en el caso del dantroleno. Esto se puede deber a que el dantroleno no actúa sobre el receptor a rianodina, ya que varios estudios han observado que el dantroleno no interfiere con la unión de la rianodina con su receptor y esta última tampoco interfiere con la unión del dantroleno con el mismo receptor, esto podría estar indicando que los sitios de unión para estos dos fármacos pueden ser distintos (Palnitkar et al., 1997).

La XeC es un potente y selectivo inhibidor de los receptores a  $IP_3$ , con una  $IC_{50}$  de 350 nM, la cual es 30 veces más baja que la  $IC_{50}$  para el receptor a rianodina. Se ha propuesto que la inhibición del receptor a  $IP_3$  por la XeC puede deberse a que ésta bloquea directamente al poro ó que modifica alostéricamente al receptor impidiendo la unión del  $IP_3$  al mismo (Gafni et al., 1997). En este estudio se utilizó la XeC (2  $\mu$ M) para investigar la participación del receptor a  $IP_3$  en el mecanismo de muerte inducido por inhibición glicolítica. Observamos que este fármaco inhibe significativamente la disminución en la reducción de MTT en los cultivos de hipocampo. La XeC ha sido probada en diversos modelos que inducen la liberación de  $Ca^{2+}$  de los receptores a  $IP_3$  (Miyamoto et al., 2000; Ozaki et al., 2002). La Xec no afecta el incremento en la concentración de calcio intracelular inducido por cafeína y rianodina en células PC12 (Gafni et al., 1997). Similarmente, el tratamiento con XeC previene la muerte neuronal y el incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular en condiciones de deficiencia energética, en un modelo de

inhibición del complejo II de la cadena transportadora de electrones (Lee et al., 2002).

***En condiciones de deficiencia energética inducida por inhibición glicolítica no hay cambio en los niveles extracelulares de aminoácidos excitadores.***

En este estudio podemos observar que la administración de yodoacetato no tuvo efecto alguno sobre los niveles extracelulares de glutamato y aspartato, excepto en los de aspartato cuando las células presentan una deficiencia energética aguda inducida por una dosis de yodoacetato de 100  $\mu$ M. En un estudio en retina de pollo se muestra un resultado similar, en donde la administración de yodoacetato no afecta la concentración de aminoácidos extracelulares (Zeevalk y Niclas, 1990, 1992). Por el contrario *in vivo*, el tratamiento con altas concentraciones de yodoacetato (1-5 mM) aumenta significativamente los niveles de aspartato y glutamato en el medio extracelular (Sandberg et al., 1985; Massieu et al., 2000). *In vitro* concentraciones altas de yodoacetato (mM), también aumentan la concentración de aminoácidos extracelulares (Madl y Burgesser, 1993; Longuemayre y Swanson, 1995).

Durante la excitotoxicidad clásica se presenta un incremento en la concentración de aminoácidos excitadores en el medio extracelular, que induce una sobreactivación de los receptores a glutamato, produciendo finalmente

muerte neuronal por agotamiento de las pozas energéticas y el incremento del calcio. En condiciones de inhibición glicolítica, hay un decremento en los niveles de ATP que promueve una disminución en la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , colapsando el gradiente iónico membranal, provocando a su vez despolarización membranal y liberación del  $\text{Mg}^{2+}$  que normalmente bloquea el receptor NMDA. Lo anterior permite la activación del receptor a NMDA aún a bajos niveles de aminoácidos excitadores en el medio extracelular (Zeevalk y Nicklas, 1990; 1992). A este proceso se le ha denominado excitotoxicidad secundaria. Nuestros resultados apuntan a que este proceso es el responsable de la muerte en nuestras condiciones experimentales ya que es dependiente de la activación de receptores a glutamato, aún cuando la concentración de aminoácidos extracelulares no aumenta.

Finalmente en base a todos los datos obtenidos en el presente trabajo podemos inferir que el mecanismo de daño inducido por la inhibición glicolítica se debe a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores a glutamato de tipo NMDA, ya que la eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y la administración de MK-801, antagonista del receptor NMDA, previenen la muerte neuronal. Además, la entrada de calcio por los receptores NMDA puede inducir liberación de calcio de las pozas intracelulares del RE. Esto puede sugerirse debido a que los fármacos que inhiben el incremento en la concentración de calcio intracelular (Bapta-AM) y la liberación de calcio de pozas intracelulares (dantroleno, rianodina y XeC) previenen la muerte en condiciones de inhibición glicolítica (Fig. 17). Las consecuencias del incremento en la concentración de calcio



intracelular podrían ser la activación de proteasas, fosfolipasas y endonucleasas y la generación de especies reactivas de oxígeno, lo cual en su conjunto contribuiría al proceso de muerte.

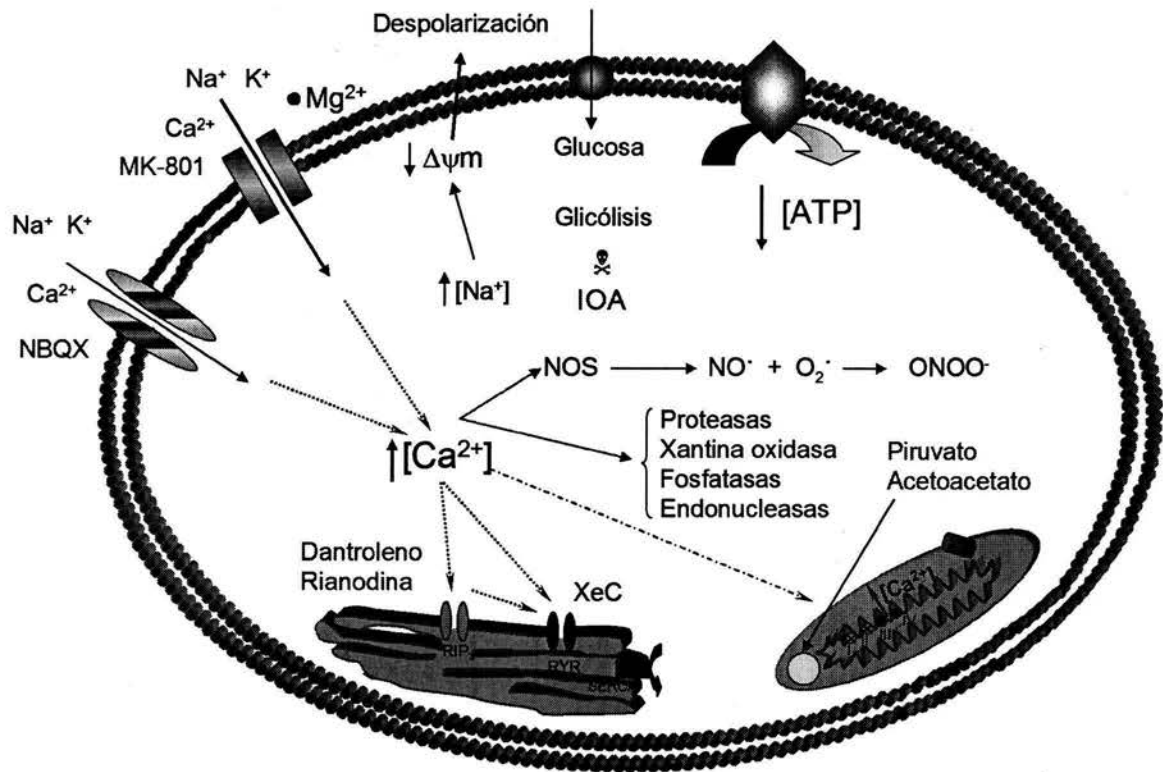


Figura 17. Mecanismos que podrían participar en la muerte neuronal inducida por inhibición glicolítica.

## CONCLUSIONES

---

La muerte inducida en condiciones de inhibición glicolítica es un proceso lento que depende en gran medida de los niveles energéticos, promoviendo un mecanismo de excitotoxicidad secundaria. Así mismo, la entrada de calcio por lo receptores NMDA y la liberación de calcio de las pozas intracelulares del retículo endoplásmico intervienen activamente en el proceso de muerte.

## REFERENCIAS

---

- Allen K.L., Almeida A., Bates T.E. and Clark J.B. 1995. Effect of reperfusion following cerebral ischemia on the activity of the mitochondrial respiratory chain in the gerbil brain. *J. Neurochem.* 65:1698-1703.
- Ames III A. 2000. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res. Rev.* 34:42-68.
- Ankarcrona M. Dypbukt J.M., Bonfoco E., Zhivotovsky B. Orrenius S., Lipton S.A., Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961-973.
- Beal M.F., Brouillet E., Jenkins B.G., Ferrante R.J., Kowall N.W., Miller J.M., Storey E., Srivasrava R., Rosen B.R. y Hyman B.T. 1993. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acids. *J. Neurosci.* 13: 4181-4192.
- Benprozvanny I.B., Ondrias K., Kaftan E., Stoyanovsky D.A. and Ehrlich B.E. 1993. Activation of the calcium release channel (ryanodine receptor) by heparine and other polyanions is calcium dependent. *Mol. Biol. Cell.* 4:347-352.
- Benveniste H., Drejer J., Schousboe A. and Diemer N.H. 1984. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis *J. Neurochem.* 43, 1369-1374.
- Benveniste H., Jorgensen M.B., Sanberg M. Christenten B., Hangberg H., Diemer N.H. 1989. Ischemic damage in hippocampal CA1 is depending on glutamate release and intact innervation from CA3. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 9:629-693.
- Berridge M.J. 1993. Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature* 361:315-325.
- Berridge, M.V. and Tan, A.S. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arc. Biochem. Biophys.* 303:474-482.
- Bilmen J.G. and Michelgeli F. 2002. Inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor by 2-aminoethoxydiphenylborate. *Cellular Signalling.* 14:955-960.

- Bouchelouche, P., Belhage, B., Frandsen, A., Drejer, J. and Schousboe. A. 1989. Glutamate receptor activation in cultured cerebellar granule cells increases cytosolic free  $Ca^{2+}$  and activation of  $Ca^{2+}$  influx. *Exp. Brain Res.* 76:281-291.
- Budd S.L. and Nicholls D.G. 1996. Mitochondrial calcium regulation and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 67: 2282-2291.
- Burke J.R., Enghild J.J., Martin M.E., Jou Y.S., Myers R.M., Roses A.D., Vance J.M. and Strittmatter W.J. 1996. Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GADPH. *Nat. Med.* 2:347-350.
- Büyükokuroglu, M.E., Gülcin, I., Oktay, M. and Küfrevioğlu Ö.I. 2001. In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacol. Research.* 44:491-494.
- Camón L., Vives P., de Vera N., Martínez E. 1998. Seizures and neuronal damage induced in the rat activation of group I metabotropic glutamate receptors with their agonist 3,5-dihydroxy-phenylglycine. *J. Neurosci. Res.* 51:339-348.
- Canevari L., Kuroda S., Bates T.E., Clark J.B., Siesjö B.K. 1997 Mitochondrial dysfunction after transient focal ischaemic in the rat is not related to a decreased activity of respiratory chain enzymes. *J. Cereb. Blood Flow Meta.* 17:1166-1169.
- Choi D.W. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1:623-634
- Choi D.W. 1992. Cell death. *J. Neurobiol.* 23:1261-1276.
- Choi D.W. 1995. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemia neuronal death. *Trends Neurosci.* 18:58-60.
- Choi D.W., Maulucci-Gedde M.A., Kriegstein A.R. 1987. Glutamate neurotoxicity in cell culture: attenuation by NMDA antagonist. *J. Neurosci.* 8:185-196.
- Chou, T.C., Li, C.Y., Wu, C.C., Yen, M.H. and Ding, Y.A. 1999. The inhibition by dantrolene of L-arginine transport and nitric oxide synthase in rat alveolar macrophages. *Anesth Analg.* 86:1065-1069.
- Daikhin Y. and Yudkoff M. 1998. Ketone bodies and brain glutamate and GABA metabolism. *Dev. Neurosci.* 20:358-364.
- Danbolt N.C. 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1-105
- Desagher S., Glowinski J., Prémont J. 1997. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J. Neurosci.* 17:9060-9067.

- Dugan L.L. and Choi D.W. 1999. Hypoxic-ischemia brain injury and oxidative stress. In Siegel G.J., Agranoff B.W., Alberts R.W., Fisher S.K. and Uhler M.D. (eds). Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical aspects. New York. Lippincott-Raven. Pag. 712-729.
- Eimerl S. and Schramm M. 1995. Resuscitation of brain neurons in the presence of  $Ca^{2+}$  after toxic NMDA-receptor activity. *J. Neurochem* 65:739-743.
- Fairman W.A., Vandenberg R.J., Arriza J.L., Kavanaugh M.P. and Amara S.G. 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*. 375, 599-603.
- Fiskum G., Murphy A.N. and Beal M.F. 1999. Mitochondrial in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19:351-369.
- Fontana C.K. and Amara, S.G. 2002. Excitatory amino acids transporters: Keeping up with glutamate. *Neurochemistry International*. 41: 313-318.
- Foster A.C., Gill R. y Woodruff. 1988. Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 8:4745-4754.
- Frandsen A. and Schousboe A. 1991. Dantrolene prevents glutamate cytotoxicity and  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem.* 56:1075-1078.
- Frandsen A. and Schousboe A. 1992. Mobilization of dantrolene-sensitive intracellular calcium pools is involved in the cytotoxicity induced by quisqualate and N-methyl-D-aspartate but not 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl) propionate and kainate in cultured cerebral cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2590-2594.
- Frandsen A. and Schousboe A. 1993. Excitatory amino acid-mediated cytotoxicity and calcium homeostasis in cultured neurons. *J. Neurochem.* 60:1202-1211.
- Gafni J., Munsch J.A., Lam T.H., Catlin C., Costa L.G., Molinski T.F. and Pessah I.N. 1997. Xestospongins: Potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Neuron* 19:723-733.
- García O. and Massieu L. 2001. Strategies for neuroprotection against L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment in vitro. *J. Neurosci. Res.* 64:418-428.

- Gemba T., Oshima T. And Ninomiya M. 1994. Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolitic inhibition in rat cultured astrocytes. *Neurosci.* 63:789-795.
- Gepdiremen, A., Düzenli, S., Hacimüftüoğlu, A., Süleyman, H. and Öztas, S. 2001. The effects of dantrolene alone or in combination with nimodopine in glutamate-induced neurotoxicity in cerebellar granule cell culture of rats pups. *Pharmacol. Research.* 43:241-244.
- Greene J.G. and Greenamyre J.T. 1995. Exacerbation of NMDA, AMPA and glutamate excitotoxicity by succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J. Neurochem.* 64:2332-2338.
- Greene J.G., Poster R.H.P., Eller R.V., Greenamyre J. T. 1993. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces and excitotoxic lesion in rat striatum. *J. Neurochem.* 61:1151-1154.
- Henneberry R.C. 1989. The role of neuronal energy in the neurotoxicity of excitatory amino acids. *Neurobiol. Aging* 10: 611-613.
- Hodgkins P.S. and Schwarcz R. 1998. Interference with cellular energy metabolism reduces kynurenic acid formation in rat brain slices: reversal by lactate and Pyruvate. *Eur. J. Neurosci.* 10:1986-1994.
- Hodgkins P.S. and Schwarcz R. 1998. Metabolic control of Kynurenic acid formation in the rat brain. *Dev. Neurosci.* 20:408-416.
- Hoesch, R.E., Yienger, K., Weireic, D. and Kao, J.P. 2002. coexistencia de funcional IP<sub>3</sub> and ryanodine receptors in vagal sensory neurons and their activation by ATP. *J. Neurophysiol.* 88:1212-1219.
- Hollmann M. and Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 17:31- 108.
- INEGI. 20001. <http://www.inwgi.gob.mx>
- Izumi Y., Benz A.M., Katsuki H. and zorumski F. 1997. endogenous monocarboxylates sustain hippocampal synaptic function and morphological integrity during energy deprivation. *J. Nuerosci.* 17:9448-9457.
- Izumi Y., Kazumoto I., Katsuki, H., Benz, A.M. and Zorumski, F. 1998.  $\beta$ -hydroxybutyrate fuels synaptic function during development. *J. Clin. Invest.* 101:1121-1132.

- Kanai Y. and Heideger M.A. 1992. Primary structure and functional characterization of a high affinity glutamate transporter. *Nature*. 360:467-471.
- Kemp J.A. and McKernan R.M. 2002. NMDA receptor pathways as drugs targets. *Nature neuroscience*. 5:1039-1042.
- Kimelberg H.K., Biddlecomb S. and Bourke R.S. 1979. SITS inhibitable Cl-transport and Na<sup>+</sup>-dependent H<sup>+</sup> production in primary astroglial functions. *Brain Res*. 173: 111-124
- Kostyuk P. and Verkhratsky A. 1994. Calcium stores in neurons and glia. *Neuroscience*. 63:381-404.
- Kostyuk P. and Verkhratsky A. 1994. Calcium stores in neurons and glia. *Neuroscience*. 63:381-404.
- Krisch, J.R. and D'Alesy, L.G. 1984. Hypoxia induced preferential ketone utilization by rat brain slices. *Stroke*. 15:319-323.
- Kritián T. and Siesjö Bo.K. 1998. Calcium in Ischemic cell death. *Stroke*. 29:705-718.
- Kuroda S., Janelidze S. and Siesjö B.K. 1999. Inmunosuppressants cyclosporina A and FK506 equally ameliorate brain damage due to 30-min middle cerebral artery occlusion in hyperglycemic rats. *Brain Res*. 843: 148-153.B.K.
- Lee, W.T., Itoh, T. and Pleasure D. 2002. Acute and chronic alterations in calcium homeostasis in 3-nitropropionic acid-treated NT2-N neurons. *Neurosci*. 113:699-708.
- Leist M. and Nicotera P. 1999. Calcium and Cell Death in *Cell Death and Diseases of the Nervous System*. Ed. Koliatosn V.E. and Ratan R.R. Humana Press Inc., Totowa, N.J.
- Longuemare M.C. and Swanson R.A. 1995. Excitatory amino acids release from astrocytes during energy failure by reversal of sodium-dependent uptake. *J. Neurosci. Res*. 40:379-386.
- Lucas D.R. and Newhouse J.P. 1957. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthal*. 58:193-201
- Lynch D.R. and Guttman R.P. 2002. Excitotoxicity: Perspectives based on N-Methyl-D-Aspartate receptor subtypes. *JPET* 300:717-123.
- Madl J.E. and Burgesser K.1993. Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J. Neurosci*. 13:4429-4444.

- Makarewicz, D., Puka-Sundvall, M., Skagiel-Kramska, J., Jablonska, B., Hagberg, H. and Lazarewicz, J.W. 2000. Ryanodine receptors in newborns rat brain: possible targets for dantrolene neuroprotection in hypoxia/ischemia. *Eur. J. Neurosci.* 12(Suppl. 11), 395.
- Makarewicz, D., Zieminska, E. and Lazarewicz, 2003. Dantrolene inhibits NMDA-induced <sup>45</sup>Ca uptake in cultured cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int.* 43:273-278.
- Malcolm C.S., Benwell K.R., Lamb H., Bebbington D. and Porter R.H.P. 2000. Characterization of Iodoacetate-mediated neurotoxicity in vitro using primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Free Rad. Biol. and Med.* 28(1): 102-107.
- Marcaida G., Miñana M.D., Grisolia S. And Felipo V. 1995. Lack of correlation between glutamate-induced depletion of ATP and neuronal death in primary cultures of cerebellum. *Brain Res.* 695:146-150.
- Massieu L. 1998. Isquemia y excitotoxicidad. *Gac Méd Méx* vol. 134 No. 6: 690-693.
- Massieu L. Del Río P.M. and Montiel T. 2002. Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. *Neurosci.* 106:669-77.
- Massieu L., Gómez-Román N. and Montiel T. 2000. In vivo Potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor Iodoacetate. *Exp. Neurobiol.* 165:257-267.
- Massieu L., Haces M.L., Montiel M. and Hernández-Fonseca K. 2003. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neurosci.* 120: 365-378.
- Matthews R.T., Ferrante R.J., Jenkins, B.G., Browne S.E., Goetz K., Berger S., Chen I.Y.C. and Beal M.F. 1997. Iodoacetate produces striatal excitotoxic lesions. *J. Neurochem.* 69:285-289
- Mattson M.P., La Ferla F.M., Chan S.L., Leissring M.A. et al. 2000. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosci.* 23:222-229
- Maus, M., Marin, P., Israël, M., Glowinski, J. and Prémont, J. 1999. Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-metyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* 11:3215-2324.



- McCulloch J.M., Bullock R. and Teadsdale G.M. 1991. Excitatory amino acids antagonists: opportunities for the treatment of ischemic brain damage in man. In: Excitatory amino acids antagonists (ed. Meldrum B.S.) Blackwell Scientific Publications. Oxford, pp 257-326.
- McDonald J.W. and Johnston M.V. 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain. Res.* 15:41-70
- Meldolesi J. 2001. Rapidly exchanging  $Ca^{2+}$  stores in neurons: molecular, structural and functional properties. *Prog. Neurobiol.* 65:309-338.
- Michaelis E.K. 1997. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 54:369-415.
- Miyamoto, S., Izumi, M., Hori, M., Kobayashi, M., Ozaki, H., and Karki, H. 2000. Xespongina C, a selective and membrane-permeable inhibitor of  $IP_3$  receptor, attenuates the positive ionotropic effect of  $\alpha$ -adrenergic stimulation in guinea-pig papillary muscle. *Britist J. Pharmacol.* 130:650-654.
- Mody, I. a MacDonald, J.F. 1995. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular  $Ca^{2+}$  release. *Trends Pharmacol. Sci.* 16:356-359.
- Mynlief M. 1997. Dissociation of postnatal hippocampal neurons for short term culture. *J. Neurosci. Meth.* 73:35-44
- Nakanishi S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* 258:597603.
- Nakayama R., Yano T., Ushijima K., Abe E. and Terasaki H. 2002. Effects of Dantrolene on extracellular glutamate concentration and neuronal death in the rat hippocampal CA1 region subjected to transient ischemia. *Anesthesiology.* 96:705-710.
- Nguyen, H.N., Chen, W. and Perry D.C. 2002. Depletion of intracellular calcium stores is toxic to SH-SY5Y neuronal cells. *Brain Research.* 924:159-166.
- Nicholls D. and Attwell D. 1990. The release and uptake de excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci.* 11:4429-4444.
- Novelli A., Reilly J.A., Lysko P.G. and Henneberry R.C. 1988. Glutamate becomes neurotoxic via the NMDA receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain. Res.* 451:205-212.

- O'Connell P.J., Klyachko V.A. and Ahern G.P. 2002. Identification of functional type 1 ryanodine receptors in mouse dendritic cells. *FEBS letters*. 512:67-70.
- Ogata T., Nakamura Y., Tsuji K., Shibata T and Kataoka K. 1995. A possible mechanisms for the hypoxia-hypoglycemia-induced release of excitatory amino acids from cultured hippocampal astrocytes. *Neurochem. Res.* 20:737-743.
- Olney J.W. 1969. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 164:719-721.
- Olney J.W. 1978. Brain lesions, obesity and others disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 164:719-721
- Opitz T. and Reymann K.G. 1991. Blockade of metabotropic glutamate receptors protects rat CA1 neurons from hypoxic injury. *Neuroreport* 2:455-457.
- Orrenius S. and Nicotera P. 1994. The calcium ion and cell death. *J. Neural Transm. Suppl* 43: 1-11.
- Ozaki, H., Hori, M., Kim, Y., Kwon, S., Ahn, D., Nakazawa, H., Kobayashi, M. and Karaki, H. 2002. Inhibitory mechanism of xestospongina-C on concentration and ion channels in the intestinal smooth muscle. *British J. Pharmacol.* 137:1207-1212.
- Ozama S., Kamiya H. and Tsuzuki K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54:581- 618.
- Palnitkar S.S., Michelson J.R., Louis C.F. and Perness J. 1997. Pharmacological distinction between dantrolene and ryanodine binding sites: evidence from normal and malignant hyperthermia-susceptible porcine skeletal muscle. *Biochem J.* 326: 847-852.
- Pang Z. and Geddes J.W. 1997. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J. Neurosci.* 17:3064-3073.
- Paschen W. 2000. Role of calcium in neuronal cell injury: Which subcellular compartment is involved? *Brain Res. Bull.* 53: 409-413.
- Paschen W. and Doutheil J. 1999. Disturbances of the functioning of endoplasmic reticulum: A key mechanisms underlying neuronal cell injury? *J. Cereb. Blood Flow and Metab.* 19:1-18.
- Pines G., Danbolt N.C., Bj/ras M, Zhang Y., Bendahan A., Eide L., Koepsell H., Storm-Mathisen J., Seeberg E., Kanner B.I. 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature.* 360:464-467.

- Pisani A., Bonsi P., Centonze D., Giacomini P. and Calabresi P. 2000. Involvement of intracellular calcium stores during oxygen/glucose deprivation in striatal large aspiny interneurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20:839-846.
- Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P. and Meldolesi J. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74:595-636.
- Randall R.D. and Thayer S.A. 1992. Glutamate-induced calcium transients triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons *J. Neurosci.* 12:1882-1895.
- Rosa R., Sanfeliu C., Rodríguez-Farré E., Frandsen A., Schousboe A. and Suñol C. 1997. *J. Neurosci. Res.* 47:27-33.
- Roses A.D. 1996. From genes to mechanisms to therapies: lessons to be learned from neurological disorders. *Nat. Med.* 2:267-269.
- Rossi D. and Sorrentino V. 2002. Molecular genetics of ryanodine receptor  $Ca^{2+}$ -release channels. *Cell Calcium.* 32: 307-319.
- Rossi D., Oshima T., Attwell D. 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature.* 403:316-321.
- Rothstein J.D., Dykes-Hoberg M., Pardo C.A., Bristol L.A., Jin L., Kunc R.W., Kanai Y., Hediger M.A., Wang Y., Schielke J.P. and Welty D.F. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron.* 16, 675-686.
- Ruiz F., Alvarez G., Ramos M., Hernández M., Bogonez E. and Satrústegi J. 2000. Cyclosporin A targets involved in protection against glutamate excitotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.* 404: 29-49.
- Ruiz, F., Alvarez, G., Pereira, R., Hernández, M., Villalba, M., Cruz, F., Cerdán, S., Bogónez, E. and Satrústegi, J. 1998. Protection by Pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. *Neuroreport.* 9:1277-1282.
- Sánchez-Carbente M.R. and L. Massieu. 1999. Transient inhibition of glutamate uptake in vivo induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired *J. Neurochem.* 72:129-138.
- Sandberg M., Nystrom N. and Hamberger A. 1985. Metabolically derived aspartate-elevated extracellular levels in vivo in iodoacetate poisoning. *J. Neurosci. Res.* 13:489-495.

- Sattler R., Charlton M.P., Haftner M., Tymianski M. 1998 Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J. Neurochem.* 71:2349-2364.
- Schinder A.F., Olson E.C., Spitzer N.C. and Montal M. 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neuroscience* 16:6125-6133.
- Schmitt A., Asan E., Püschel B and Kugler P. 1997. Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: Nonradioactives in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *J. Neurosci.* 117, 1-10.
- Schulze H., Schuler A., Stuber Dobeli H., Langen H., Hubert G. 1992. Rat brain glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase interacts with the recombinant cytoplasmic domain of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 60:1915-1922.
- Seaton T.A., Cooper J.M. and Schapira A.H. 1998. Cyclosporin inhibition of apoptosis induced by mitochondrial complex I toxins. *Brain Res.* 809:12-17.
- Seeburg P.H. 1993. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 16:359-364.
- Siesjö B.K. 1981. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1:155-185.
- Siesjö B.K. and Bengtsson F. 1989. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia and spreading depression: a unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9:127-140.
- Silver I.A., Deas J. and Erecinska M. 1997. Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience.* 78:589-601
- Simon R.P., Swan J.H., Griffith T. and Meldrum B.S. 1984. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science.* 226:850-852.
- Simpson P.B. and Rusell J.T. 1998. Role of mitochondrial  $Ca^{2+}$  regulation in neuronal and glial cell signaling. *Brain Res. Rev.* 26:72-81.
- Simpson, P.B., Challiss, A.J. and Nahorski, S.R. 1993. Involvement of intracellular stores in the  $Ca^{2+}$  responses to N-methyl-D-aspartate and depolarization in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 61:760-763.

- Simpson, P.B., Nahorski S.R. and Challis R.A. 1996. Agonist-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from stores expressing inositol 1,4,5-triphosphate receptors and ryanodine receptors in cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* 67:364-373.
- Smith Q.R. 2000. Transport of glutamate and other amino acids at the Blood-Brain Barrier. *J. Nutr.* 130:1016S-1022S.
- Smith S. and Nahorki S. 1993. Characterization and distribution of inositol polyphosphate and ryanodine receptor in the rat brain. *J. Neurochem.* 60: 1605-1614.
- Stone T.W. and Addae J.I. 2002. The pharmacological manipulation of glutamate receptor and neuroprotection. *Eur. J. Pharmacol.* 447:285-296.
- Store T., Schulte S., Hoffman K., Stoffel W. 1992. Structure, expression and functional analysis of a  $\text{Na}^{+}$ -dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:10955-10959.
- Storey E., Hyman B.T., Jenkins B., Brouillet E., Miller J.M., Rosen B.R., Beal M.F. 1992. 1-Methyl-4-phenylpyridinium produces excitotoxic lesions in rat striatum as result of impairment of oxidative metabolism. *J. Neurochem.* 58:1975-1978.
- Suzuki, M., Suzuki, M., Sato, K., Dohi, S., Sato T., Matsuura, A. and Hiraide, A. 2001. Effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *J. Pharmacol.* 87:143-150.
- Takadera T. And Ohyashiki T. 1998. Apoptotic cell death and CPP32-like activation induced by thapsigargin and their prevention by nerve growth factor in PC12 cells. *Biochem Biophys Acta Mol Cell Res* 1410:63-71.
- Taylor C.W. and Laude A.J. 2002.  $\text{IP}_3$  receptor and their regulation by calmodulin and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ . *Cell Calcium.* 32: 321-334.
- Taylor C.W., Genazzani A.A. and Morris S.A. 1999. Expression of inositol triphosphate receptors. *Cell Calcium* 26: 237-251.
- Turner, D.J, Segura, B. J., Cowles, R.A., Zhang, W. and Mulholland, M.W. 2001. Functional overlap of  $\text{IP}_3$ - and cADP-ribose-sensitive calcium stores in guinea pig myenteric neurons. *Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281:G208-G215.
- Tymianski M., Wallace M.C., Spigelman I., Uno M., Carlen P.L, Tator C.H., y Charlton M.P.1993. Cell-permeant  $\text{Ca}^{2+}$  chelator reduce early excitotoxic and ischemic neuronal injury in vitro and in vivo. *Neuron.* 11:221-235.

- Tymiansky M. 1995. Neuroprotección in vitro and in vivo by cell-permeant  $\text{Ca}^{2+}$  chelator. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22:299-300.
- Uchino H., Elmér E., Uchino K., Lindvall O. and Siesjö. 1995. Cyclosporina A dramatically ameliorates CA1 hippocampal damage following transient forebrain ischemia in the rat. *Acta. Physiol. Scand.* 155: 469-471.
- Uto A., Dux E., Kusumoto M. And Hossmann K.-A. 1995. Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia in vitro. *J. Neurochem.* 64:2185-2191.
- Veech R., Chance B., Kashiwaya Y., Lardy H.A. and Cahill G.F. 2001. Ketone bodies, potential therapeutic uses. *IUBMB Life.* 51:241-247.
- Velasco I., Tapia R., and Massieu L. 1996. Inhibition of glutamate and neuronal induces progressive accumulation of extracellular glutamate and neuronal damage in rat cortical cultures. *J. Neurosci Res.* 44:551-561.
- Verkhratsky A. 2002. The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signaling. *Cell Calcium.* 32: 393-404.
- Verkhratsky A. and Petersen O.H. 2002. The endoplasmic reticulum as an integrating signaling organelle: from neuronal signaling to neuronal death. *Eur. J. Pharmacol.* 447: 141-154.
- Villalba, M., Martínez-Serrano A., Gómez-Puertas P., Blanco P., Börner C., Villa A., Casado M., Giménez C., Pereira R., Bogonez E., Pozzan T., and Satrústegui. J. 1994. The role of Pyruvate in neuronal calcium homeostasis. *J. Biol. Chem.* 269:2468-2476.
- Wang, C., Nguyen, H.N., Maguire J.L. and Perry D.C. 2002. Role of intracellular store in cell death from oxygen-glucose deprivation in a neuronal cell line. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22:206-214.
- Watkins J.C. and Olverman H.J. 1987. Agonist and antagonists for excitatory amino acids receptors. *Trends Neurosci.* 100:265-272.
- Wei H.F. and Perry D.C. 1996. Dantrolene is cytoprotective in two methods of neuronal cell death. *J. Neurochem.* 67:2390-2398.
- Wie, H, Leeds, P., Chen, R.W., Wie, W., Leng, Y., Bredesen, D.E., and Chuang D.M. 2000. Neuronal apoptosis induced by pharmacological concentration of 3-hydroxykynurenine: characterization and protection by dantrolene and Bcl-2 overexpression. *J. Neurochem.* 75:81-90.

- Wieloch T., Lindvall O., Blomquist P. and Gage F.H. 1985. Evidence for amelioration of ischemic neuronal damage in the hippocampal formation by lesions of the perforant path. *Neurol. Res.* 7:24-26
- Wu, Ch. and Yen, M. 1997. Beneficial effects of dantrolene on lipopolysaccharide-induced haemodynamic alterations in rats and mortality in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 327:17-24.
- Wuytack F., Raeymaekers L. and Missiaen L. 2002. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium.* 32:279-305.
- Yoshimoto T. and Siesjö B.K. 1999. Posttreatment with the immunosuppressant cyclosporin A in transient focal ischemia. *Brain Res.* 839: 283-291.
- Zaidan E. and Sims N.R. 1994. The calcium content of mitochondria from brain subregions following short-term forebrain ischemia and recirculation in the rat. *J. Neurochem.* 63:1812-1819.
- Zeevalk G.D. and Nicklas W.J. 1990. Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253:1285-1292.
- Zeevalk G.D. and Nicklas W.J. 1992. Evidence that loss of the voltage-dependent  $Mg^{2+}$  block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activations during inhibition of neuronal metabolism. *J. Neurochem.* 59:1211-1220.
- Zhang L., Andou Y., Masuda S., Mitani A., Kataoka K. 1993. Dantrolene protects against ischemic, delayed neuronal death in gerbil brain. *Neurosci. Lett.* 158:287-288.
- Zhao F., Li P., Chen W., Louis C.F., Fruen B.R. 2001. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor  $Ca^{2+}$  release channels. *J.B.C.* 276: 13810-13816.